UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Síntese e avaliação da segurança *in vitro* da rutina e do succinato de rutina visando sua incorporação em formulações fotoprotetoras eficazes associados a filtros químicos e físico

Carla Aparecida Pedriali Moraes

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:
Prof.^a Assoc.^a Maria Valéria Robles Velasco

São Paulo
2012

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Moraes, Carla Aparecida Pedriali

M827s Síntese e avaliação da segurança *in vitro* da rutina e do succinato de rutina visando sua incorporação em formulações fotoprotetoras eficazes associados a filtros químicos e físico / Carla Aparecida Pedriali Moraes. -- São Paulo, 2011.
210p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador: Velasco, Maria Valéria Robles

1. Proteção solar : Cosméticos 2. Fator de proteção solar : Cosméticos 3. Química verde 4. Cosméticos : Segurança : Tecnologia I. T. II. Velasco, Maria Valéria Robles, orientador.

668.55 CDD

Carla Aparecida Pedriali Moraes

Síntese e avaliação da segurança *in vitro* da rutina e do succinato de rutina visando sua incorporação em formulações fotoprotetoras eficazes associados a filtros químicos e físico

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof.^a Assoc.^a Maria Valéria Robles Velasco
orientadora/presidente

Patrícia Maria Berardo Gonçalves Maia Campos
1º. examinador

Herida Regina Nunes Salgado
2º. examinador

Elizabeth Pinheiro Gomes Arêas
3º. examinador

André Passaglia Schuch
4º. examinador

São Paulo, 22 de março de 2012.

Dedico este trabalho...

a Deus, pelo dom da vida, por todas as oportunidades que me concedeu e pela força para superar as dificuldades.

Ao meu querido companheiro e esposo Dante, com seu exemplo me mostrou outras maneiras de ver as coisas, me apoiou e juntos superamos as dificuldades desta jornada.

Aos meus pais Fátima e Antonio pelo cuidado e proteção, por todo o sacrifício que passaram para que me proporcionassem até chegar neste momento.

Às minhas irmãs queridas Tatiane e Marcelle que sempre me apoiaram.

Aos meus queridos sobrinhos: Vitória e Kaio.

Aos meus avós Nair e Francisco, Natalino (*in memorian*) e Lúcia (*in memorian*) que mesmo não presentes fisicamente estiveram juntos em atitudes, pensamentos e gestos.

Aos meus queridos amigos (irmãos de coração) que são tão importantes para mim pelo apoio, carinho e incentivo em todos os momentos: Karla, Airam, Paulo, Tatiana, Paula e Robson

À Psicanálise e aos psicanalistas que estiveram junto comigo neste período de minha vida, que me proporcionaram um olhar mais profundo de mim mesma e com isto um caminhar mais leve e seguro.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora e professora, **Dr^a. Maria Valéria Robles Velasco** por ter confiado em mim, pelo apoio e incentivo disponibilizados durante estes anos de convivência.

Ao professor, **Dr. André Rolim Baby** pela oportunidade concedida na área da Cosmetologia e pela amizade de longo tempo.

Aos professores que participaram da banca de qualificação, **Dr. Marcos Antonio Correa** (FCF/UNESP) e **Dr^a. Gislaine Ricci Leonardi** (UNIFESP/Diadema) pelos ensinamentos, pela confiança e pelos apontamentos realizados.

Aos professores encontrados no Congresso XX COLAMIQ, **Dr. Marlus Chorilli** (FCF/UNESP) e **Dr^a. Gislaine Ricci Leonardi** (UNIFESP/Diadema) pelos exemplos e ensinamentos deixados.

Às minhas estagiárias e amigas Samara Suemi Iizuka, Raquel Omegna Gago Madruga e Denise Pelegrini Veronezi que se mostraram sempre prestativas e colaboraram em partes deste trabalho.

Ao Pesquisador **Adjaci Uchoa Fernandes**: Instituto de Química (IQ/USP), pela análise dos dados espectros de RMN.

Às técnicas do laboratório de Cosmetologia: Claudinéia Aparecida Sales de Oliveira Pinto e Carla Aparecida Gonçalves pelo apoio e atenção disponibilizados.

Aos antigos amigos (fase de transição entre o Mestrado e Doutorado): Dayane, Carla Oliveira, Dino, Adjaci, Divino, Cristiane, Vinícius, Milton, Mandela, Tatiana e Helena, pelas conversas, aprendizados, brincadeiras e pela ótima convivência.

Ao Departamento de Fármaco e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, pela oportunidade de realização do curso de Doutorado.

Aos colaboradores, que confiaram em meu trabalho e colocaram à disposição a área experimental, o laboratório, seus funcionários e alunos. Isto foi um grandioso auxílio ao término deste trabalho:

À Profa. Dr^a. Inar Alves de Castro: Laboratório de Bioquímica de Alimentos Naturais do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental (FCF/USP).

Ao Prof. Dr. Leandro Helgueira de Andrade: Departamento de Química Fundamental do Instituto de Química (IQ/USP).

Ao Prof. Dr. Antonio Salatino: Laboratório de Fitoquímica e Sistemática Molecular do Departamento de Botânica (IB/USP).

Ao Prof. Dr. Carlos Frederico Martins Menck e Pós-Doutorando André Passaglia Schuch: Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB/USP).

À Profa. Dr^a. Cristina Helena dos Reis Serra: Departamento de Farmácia da Faculdade Ciências Farmacêuticas (FCF/USP).

À Profa. Dr^a. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto e Prof^a. Dra. Telma Mary Kaneko: Departamento de Farmácia da Faculdade Ciências Farmacêuticas (FCF/USP).

À Profa. Dr^a. Elizabeth Pinheiro Gomes Arêas: Departamento de Química Fundamental do Instituto de Química (IQ/USP).

Ao Prof. Dr. Dante Augusto Moraes e à Profa. Dr^a. Thereza Christina Vessoni Penna: Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF/USP).

À Comissão de Apoio a Pesquisa do Ensino Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de doutorado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

“Se...

Eu pudesse deixar algum presente a você, deixaria aceso o sentimento de amar a vida dos seres humanos.

A consciência de aprender tudo o que foi ensinado pelo tempo a fora.

Lembraria os erros que foram cometidos para que não mais se repetissem.

A capacidade de escolher novos rumos.

Deixaria para você, se pudesse, o respeito àquilo que é indispensável.

Além do pão, o trabalho.

Além do trabalho, a ação.

E, quando tudo mais faltasse, um segredo: o de buscar no interior de si mesmo a resposta e a força para encontrar a saída”

Mahatma Gandhi

“Um dia a gente aprende que...”

Depois de algum tempo você aprende a diferença, a sutil diferença, entre dar a mão e acorrentar uma alma.

E você aprende que amar não significa apoiar-se, que companhia nem sempre significa segurança, e começa a aprender que beijos não são contratos, e que presentes não são promessas.

Começa a aceitar suas derrotas com a cabeça erguida e olhos adiante, com a graça de um adulto e não com a tristeza de uma criança; aprende a construir todas as suas estradas no hoje, porque o terreno do amanhã é incerto demais para os planos, e o futuro tem o costume de cair em meio ao vão.

Depois de um tempo você aprende que o sol queima se ficar exposto por muito tempo, e aprende que não importa o quanto você se importe, algumas pessoas simplesmente não se importam... aceita que não importa quão boa seja uma pessoa, ela vai feri-lo de vez em quando e você precisa perdoá-la por isso.

Aprende que falar pode aliviar dores emocionais, e descobre que se leva anos para se construir confiança e apenas segundos para destruí-la, e que você pode fazer coisas em um instante, das quais se arrependerá pelo resto da vida; aprende que verdadeiras amizades continuam a crescer mesmo a longas distâncias, e o que importa não é o que você tem na vida, mas quem você tem na vida, e que bons amigos são a família que nos permitiram escolher.

Aprende que não temos que mudar de amigos se compreendermos que eles mudam; percebe que seu melhor amigo e você podem fazer qualquer coisa, ou nada, e terem bons momentos juntos.

Descobre que as pessoas com quem você mais se importa na vida são tomadas de você muito depressa, por isso sempre devemos deixar as pessoas que amamos com palavras amorosas; pode ser a última vez que as vejamos.

Aprende que as circunstâncias e os ambientes tem influência sobre nós, mas nós somos responsáveis por nós mesmos.

Começa a aprender que não se deve compará-lo com os outros, mas com o melhor que pode ser.

Descobre que se leva muito tempo para se tornar a pessoa que quer ser, e que o tempo é curto.

Aprende que não importa onde já chegou, mas onde se está indo, mas se você não sabe para onde está indo qualquer lugar serve.

Aprende que ou você controla seus atos ou eles o controlarão, e que ser flexível não significa ser fraco ou não ter personalidade, pois não importa quão delicada e frágil seja uma situação, sempre existem dois lados.

Aprende que heróis são pessoas que fizeram o que era necessário fazer, enfrentando as consequências.

Aprende que paciência requer muita prática.

Descobre que algumas vezes a pessoa que você espera que o chute quando você cai é uma das poucas que o ajudam a levantar-se; aprende que maturidade tem mais a ver com os tipos de experiência que se teve e o que você aprendeu com elas do que com quantos aniversários você celebrou; aprende que há mais dos seus pais em você do que você supunha; aprende que nunca se deve dizer a uma criança que sonhos são bobagens; poucas coisas são tão humilhantes... e seria uma tragédia se ela acreditasse nisso.

Aprende que quando se está com raiva se tem o direito de estar com raiva, mas isso não te dá o direito de ser cruel.

Descobre que só porque alguém não o ama do jeito que você quer que ame não significa que esse alguém não o ama com tudo o que pode, pois existem pessoas que nos amam, mas simplesmente não sabem como demonstrar ou viver isso.

Aprende que nem sempre é suficiente ser perdoado por alguém; algumas vezes você tem que aprender a perdoar-se a si mesmo.

Aprende que com a mesma severidade com que julga, você será em algum momento condenado.

Aprende que não importa em quantos pedaços seu coração foi partido, o mundo não pára para que você o conserte.

Aprende que o tempo não é algo que possa voltar para trás, portanto, plante seu jardim e decore sua alma ao invés de esperar que alguém lhe traga flores, e você aprende que realmente pode suportar... que realmente é forte e que pode ir muito mais longe depois de pensar que não se pode mais.

Descobre que realmente a vida tem valor e que você tem valor diante da vida!

Nossas dúvidas são traidoras e nos fazem perder o bem que poderíamos conquistar, se não fosse o medo de tentar.”

William Shakespeare

SUMÁRIO

RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xv
LISTA DE QUADROS	xviii
LISTA DE TABELAS	xix
LISTA DE EQUAÇÕES	xxi
LISTA DE FIGURAS	xxii

CAPÍTULO 1. SÍNTESE DO SUCCINATO DE RUTINA E AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA SEGURANÇA

1 RESUMO	24
2 REVISÃO DA LITERATURA	25
2.1 Plantas medicinais no Brasil e a pesquisa	25
2.2 Química Verde e a relação produtiva	28
2.3 Testes alternativos para a avaliação da segurança	30
3 OBJETIVOS	35
3.1 Geral	35
3.2 Específicos	35
4 METODOLOGIA	36
4.1 Material	36
4.1.1 Princípio ativo	36
4.1.2 Reagentes	36
4.1.3 Equipamentos e acessórios	37
4.2 Métodos	38
4.2.1 Síntese química, purificação, determinação estrutural e identificação do succinato de rutina.....	38
4.2.2 Síntese alternativa enzimática	39
4.2.3 Caracterização físico-química da rutina e do succinato de rutina	42
4.2.3.1 Coeficiente de partição octanol-água (Log <i>P</i>)	42
4.2.3.2 Determinação da solubilidade	42
4.2.4 Avaliação da segurança <i>in vitro</i>	43
4.2.4.1 Descrição da metodologia: cultura celular	44
4.2.4.2 Análise estatística	45
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1 Elucidação estrutural e identificação dos compostos sintetizados	46
5.2 Caracterização físico-química da rutina e do succinato de rutina	52
5.3 Avaliação da segurança <i>in vitro</i> da rutina e do succinato de rutina	54
6 CONCLUSÕES	57
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

CAPÍTULO 2. EFEITOS DA RADIAÇÃO SOLAR E O DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DE FORMULAÇÕES FOTOPROTETORAS INCORPORADAS DE DERIVADOS DA RUTINA

1 RESUMO	62
2 REVISÃO DA LITERATURA	63
2.1 Radiação ultravioleta (UVB) e (UVA) e suas características.....	63
2.2 Doenças principais da pele relacionadas à radiação solar	64
2.2.1 Eritema ou queimadura solar	64

2.2.2	Pigmentação solar	64
2.2.3	Queratose solar	65
2.2.4	Carcinoma basocelular (CBC)	65
2.2.5	Carcinoma espinocelular (CEC)	65
2.2.6	Melanoma maligno	65
2.3	Envelhecimento cutâneo e os efeitos da radiação UV	66
2.4	Mecanismos de proteção da pele contra os danos da radiação UV	70
2.5	Formulações fotoprotetoras: componentes, tipos e importância	74
2.6	Novas substâncias fotoprotetoras de origem vegetal: os flavonoides	87
3	OBJETIVOS	92
3.1	Geral	92
3.2	Específicos	92
4	METODOLOGIA	92
4.1	Material	92
4.1.1	Princípio ativo	92
4.1.2	Reagentes	92
4.1.3	Equipamentos e acessórios	94
4.2	Métodos	95
4.2.1	Desenvolvimento e seleção das formulações fotoprotetoras	95
4.2.1.1	Formulações-testes fotoprotetoras: componentes e procedimentos de preparo	95
4.2.2	Avaliação Preliminar da Estabilidade (APE)	108
4.2.2.1	Teste de centrifugação	108
4.2.2.2	Teste de estresse térmico	108
4.2.3	Teste de Estabilidade Acelerada (TEA)	109
4.2.4	Parâmetros e critérios adotados nas avaliações de estabilidade	109
4.2.4.1	Parâmetros organolépticos	111
4.2.4.2	Parâmetros físico-químicos	111
a)	Determinação do pH das formulações	111
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	112
5.1	Desenvolvimento e seleção das formulações fotoprotetoras	112
6	CONCLUSÕES	128
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	129

CAPÍTULO 3. AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA FOTOPROTETORA E COMPORTAMENTO REOLÓGICO

1	RESUMO	137
2	REVISÃO DA LITERATURA	138
2.1	Histórico dos estudos de eficácia fotoprotetora.....	138
2.2	Metodologia de análise da eficácia fotoprotetora <i>in vivo</i>	141
2.3	Metodologias de análise da eficácia fotoprotetora <i>in vitro</i>	145
2.3.1	Análise espectrofotométrica de soluções diluídas	145
2.3.2	Determinação da eficácia fotoprotetora <i>in vitro</i> por transmitância difusa	148
2.3.2.1	Transmitância difusa e geometria óptica	148
2.3.2.2	Parâmetros analíticos	150
2.3.2.3	Relação entre comprimento de onda crítico (λ_c), razão UVA/UVB e a eficácia fotoprotetora UVA <i>in vitro</i>	155
2.3.2.4	Substratos	158
2.4	Estabilidade de emulsões e comportamento reológico	159

	2.4.1 Conceitos reológicos e sua importância na área cosmética	160
	2.4.2 Principais grandezas reológicas	163
	2.5 Coletânea resumida da bibliografia consultada	164
3	OBJETIVOS	167
	3.1 Geral	167
	3.2 Específicos	167
4	METODOLOGIA	168
	4.1 Material	168
	4.1.1 Princípio ativo	168
	4.1.2 Reagentes	168
	4.1.3 Equipamentos e acessórios	169
	4.2 Métodos	170
	4.2.1 Produção das formulações fotoprotetoras	170
	4.2.2 Teste de Estabilidade Normal (TEN)	174
	4.2.3 Parâmetros e critérios adotados nas avaliações de estabilidade	175
	4.2.3.1 Tratamento estatístico	176
	4.2.3.2 Parâmetros organolépticos	177
	4.2.3.3 Parâmetros físico-químicos e funcionais das formulações fotoprotetoras	177
	a) Determinação do pH das formulações	178
	b) Determinação do perfil reológico	178
	c) Atividade antirradicalar pelo método de DPPH [•] (2,2-difenil-1- picriidrazila)	179
	d) Eficácia fotoprotetora <i>in vitro</i>	180
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	181
	5.1 Desenvolvimento de formulações fotoprotetoras	181
	5.2 Parâmetros organolépticos	182
	5.3 Determinação de pH	185
	5.4 Análise do comportamento reológico das formulações	186
	5.5 Análise da característica funcional: atividade antirradicalar	193
	5.6 Análise da característica funcional: eficácia fotoprotetora	195
6	CONCLUSÕES	201
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	203

RESUMO

MORAES, C.A.P. **Síntese e avaliação da segurança *in vitro* da rutina e do succinato de rutina visando sua incorporação em formulações fotoprotetoras eficazes associados a filtros químicos e físico.** 2012. 210p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

A tendência atual do mercado cosmético é desenvolver produtos que contenham insumos de origem vegetal. O objetivo deste trabalho foi a aplicação da Tecnologia da *Química Verde* na síntese da rutina visando o aumento da estabilidade dessa em formulações cosméticas com sua eficácia antioxidante e fotoprotetora. Realizou-se a síntese química por meio da introdução de grupos carboxilatos às hidroxilas do dissacarídeo na molécula de rutina, gerando como produto final o succinato de rutina. Este derivado e/ou a rutina foram incorporados em 74 formulações-teste e, selecionadas 12 (sistemas emulsionados O/A), após serem submetidas à Avaliação Preliminar de Estabilidade (APE) e ao Teste de Estabilidade Acelerada (TEA), sob variações de temperatura e umidade. Utilizou-se agentes emolientes e silicones para facilitar a solubilização e/ou dispersão dos filtros químicos e físicos. A segunda etapa deste trabalho foi a avaliação da segurança do succinato de rutina, tendo como padrão a rutina, por meio do método alternativo de toxicidade *in vitro*, o XTT. Após o *screening* das concentrações ensaiadas, as que apresentaram menor nível de morte celular foram respectivamente, 0,1% ou 1 mg/mL (rutina) e 0,4% ou 4 mg/mL (succinato de rutina). Segundo os resultados do TEA, as formulações contendo succinato de rutina associada ou não aos filtros solares em ambas as bases cosméticas (**A** - Crodafo[®]CES + Uniox[®]C e **B** - Hostacerin[®]SAF) foram selecionadas para a continuidade do Teste de Estabilidade Normal (TEN). Neste teste, as emulsões fotoprotetoras foram avaliadas frente aos parâmetros: propriedades organolépticas (aspecto, cor e odor), aspectos físico-químicos (medição de pH e de viscosidade) e funcionais (atividade antirradicalar e eficácia fotoprotetora *in vitro*). Os resultados apresentados pela formulação **MS** (succinato de rutina associado aos filtros químicos e físico) foram: homogeneidade, a não modificação de cor e odor em temperatura ambiente, a não alterações significativas de valores de pH, de área de histerese, de atividade antirradicalar e de FPS. Esta estabilidade ocorreu principalmente quando incorporada à base cosmética **A** num período de 90 dias em 45°C e 75% de umidade, 5°C e 25°C. Concluiu-se que a funcionalidade desta associação **MS** mostrou-se mais estável, mantendo a eficácia quanto à proteção solar e dentro de suas características reológicas poderia ser a mais bem aceita pelo consumidor.

Palavras-chave: rutina, succinato de rutina, FPS *in vitro*, estabilidade, síntese – Química Verde.

ABSTRACT

MORAES, C.A.P. **Synthesis and in vitro safety evaluation of rutin and rutin succinate aiming their incorporation into effective sunscreens associated with chemical and physical filters.** 2012. 210p. Thesis (Doctoral Degree) – School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2012.

The current cosmetic market trend is to develop products containing vegetables raw materials. This work proposed to use the Technology of Green Chemical to increase the rutin stability in cosmetic formulas as regards of its antioxidant and photoprotective properties. The chemical synthesis was realized by the introduction of carboxylate groups on sugar moiety of rutin producing in rutin succinate. This derivative and/or rutin were incorporated into 74 test formulas. After the undergoing to preliminary and accelerated stabilities under different temperature and humidity conditions were selected 12 formulas (O/W emulsions). Emollient agents and silicones were used to improve the solubility and/or dispersion of the chemical and physical filters. The second stage of this work was to evaluate the safety of rutin succinate, rutin used as an internal standard, using the alternative method of in vitro toxicity, the XTT. After the screening of tested concentrations, the concentrations of the samples with the lowest level of cell death were 0.1% or 1 mg/mL (rutin) and 0.4% or 4 mg/mL (rutin succinate), respectively. According to results obtained in accelerated stability testing, the formulations containing rutin succinate in combination or not with UV filters in both O/W emulsions (**A** - Crodafo[®] CES + Uniox[®] C and **B** - Hostacerin[®] SAF) were selected for the long term stability test. In this test the sunscreens were evaluated in the following parameters: the organoleptic properties (appearance, color and odor), physico-chemical aspects (pH value and viscosity) and functional (antiradicalar activity and in vitro photoprotection efficacy). The results presented by the **MS** formula (rutin succinate associated with physical filter and chemical filters) were: uniformity, stability of color and odor at room temperature and showed no significant difference, as well stability in: pH and SPF (Sun Protection Factor) values, hysteresis area, antiradicalar activity. These results were observed mainly when it was incorporated to O/W emulsion **A** (90 days of analyses at 45°C and 75% humidity, 5°C and 25°C). It was observed the functionality of **MS** association was more stable, maintaining photoprotective efficacy and within their rheological properties could be more accepted by consumers.

Keywords: rutin, rutin succinate, in vitro SPF, stability, synthesis – Green Chemistry

LISTA DE SÍMBOLOS E SIGLAS

- γ - taxa de cisalhamento
- ^{13}C -RMN – ressonância magnética nuclear de carbono
- ^1H -RMN - ressonância magnética nuclear de próton
- $^1\text{O}_2$ - oxigênio singlete
- 4-MBC - 4- methylbenzylidene camphor
- ACTH - hormônio adrenocorticotrópico
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- APE - Avaliação Preliminar de Estabilidade
- BEMT- bis-etilhexiloxifenol metoxifeniltriazina
- BHT - butil-hidroxitoluol
- BMBM – butil-metoxidibenzoil-metano
- BP-3 - benzofenona-3
- BP-4- benzofenona-4
- CBC - Carcinoma basocelular
- CCD - Cromatografia de Camada Delgada
- CEC - Carcinoma espinocelular
- COLIPA – *European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association*
- cP – centiPoise
- c-UA - ácido *cis* urocânico
- DBT – dietilhexilbutamido triazona
- DMAP– 4-dimetilaminopiridina
- DMEM - meio de cultura Eagle Modificado por Dulbecco (*do inglês, Dulbecco Modified Eagle Medium*)
- DMF - N,N-dimetilformamida
- DPDT – tetrassulfonato de fenildibenzimidazol dissódico
- DPPH $^\bullet$ - 2,2-difenil-1-picriidrazila
- DTS - drometrizol trisiloxano
- EHDP – etilhexildimetil PABA
- EHMC – etilhexilmetoxicinamato
- EHS – salicilato de etilhexila
- EHT – etilhexil triazona
- FCS - soro fetal bovino (*do inglês, Fetal Calf Serum*)

FDA – *Food and Drug Administration*
FPA - Fator de Proteção da radiação UVA
FPS - Fator de Proteção Solar
FSH – hormônio folículo estimulante
GH - hormônio do crescimento
 H_2O_2 - peróxido de hidrogênio
HMS – homomentilsalicilato (homosalato)
HOCl - ácido hipocloroso
IL – interleucina
IMC – p-metoxicinamato de isoamila
INCI - *International Nomenclature of Cosmetic Ingredients*
IPD – *Immediate Pigment Darkening*
IR - radiação infravermelha
JCIA - *Japan Cosmetic Industry Association*
KCl – cloreto de potássio
 $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ - hidrogenofosfato de potássio
LH - hormônio luteinizante
MA- antranilato de metila
MBBT – metileno bis-benzotriazol tetrametilbutilfenol
MED - Dose Eritematogênica Mínima (do inglês, *Minimal Erythema Dose*)
MMPs - metaloproteases
mPa.s - miliPascal.segundo
MPD – *Minimal Pigmenting Dose*
 Na_2HPO_4 - fosfato dibásico de sódio
NaCl – cloreto de sódio
 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ - fosfato monobásico de sódio monoidratado
 $\text{NO}^\bullet$ - óxido nítrico
 $\text{O}_2^{\bullet-}$ - ânion radical superóxido
 O_3 - ozônio
OCR - octocrileno
 $\text{OH}^\bullet$ - radical hidroxila
PABA - ácido *para*-aminobenzóico
PBSA- ácido 2-fenilbenzimidazol-5-sulfônico
PPD – *Persistent Pigment Darkening*

PS15- polisilicone-15

PVPP - polivinilpolipirrolidona

ROO[•] - radical peroxila

ROS - espécies reativas de oxigênio

SOD - superóxido-dismutase

TDSA – ácido tereftalilideno dicânfora sulfônico

TEA - Teste de Estabilidade Acelerada

TEN - Teste de Estabilidade Normal

TiO₂ – dióxido de titânio

t-UA- ácido *trans* urocânico

UV – radiação ultravioleta

UVA-PF - Fator de Proteção em relação à radiação UVA

VIS – visível

XTT – ácido sulfônico (sódio 3'-[fenilaminocarbonil)-3,4-tetrasólio]-bis (4-metoxi-6-nitro)

ZnO – óxido de zinco

η' - viscosidade aparente

λ_c – comprimento de onda crítico

τ - tensão de cisalhamento

LISTA DE QUADROS

CAPÍTULO 1. SÍNTESE DO SUCCINATO DE RUTINA E AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA SEGURANÇA

CAPÍTULO 2. EFEITOS DA RADIAÇÃO SOLAR E O DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DE FORMULAÇÕES FOTOPROTETORAS INCORPORADAS DE DERIVADOS DA RUTINA

Quadro 1 –	Características clínicas do envelhecimento intrínseco e extrínseco (fotoenvelhecimento)	69
Quadro 2 –	Fototipos de pele e Fatores de Proteção Solar (FPS) recomendados	75
Quadro 3 –	Descrição dos tipos de filtros químicos e físicos, suas propriedades físico-químicas e a sua máxima concentração permitida segundo a legislação vigente	78

CAPÍTULO 3. AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA FOTOPROTETORA E COMPORTAMENTO REOLÓGICO

Quadro 1 –	Classificação de Proteção em relação à radiação UVA (PA) do Sistema Japonês e valores de PPD (Pigmentação Escurecida e Persistente)	144
Quadro 2 –	Ponderação empregada no cálculo de FPS por espectrofotometria, conforme SAYRE <i>et al.</i> , 1979(a)	147
Quadro 3 –	Intervalo de comprimentos de onda críticos e sua relação com o nível de proteção a razão UVA/ UVB	152
Quadro 4 –	Sistema <i>Boot's Star Rating</i> relacionado com a razão UVA/UVB conforme <i>Revised Guidelines to the Practical Measurement of UVA</i>	154
Quadro 5 –	Literatura pesquisada quanto às correlações entre as metodologias de medição de eficácia fotoprotetora <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	165

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1. SÍNTESE DO SUCCINATO DE RUTINA E AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA SEGURANÇA

Tabela 1 –	Designação quantitativa do espectro de ^{13}C -RMN da rutina e dos seus derivados (D_6 – DMSO)	51
Tabela 2 –	Solubilidade da rutina e do succinato de rutina em solventes apróticos e próticos. Determinação experimental dos valores de $\log P$ no sistema octanol/água	53

CAPÍTULO 2. EFEITOS DA RADIAÇÃO SOLAR E O DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DE FORMULAÇÕES FOTOPROTETORAS INCORPORADAS DE DERIVADOS DA RUTINA

Tabela 1 –	Matérias-primas utilizadas na elaboração das formulações fotoprotetoras acompanhadas de suas nomenclaturas INCI, suas respectivas funções e suas concentrações usuais	101
Tabela 2 –	Descrição quali- e quantitativa das formulações autoemulsionantes cosméticas utilizadas na 1ª Etapa do processo de desenvolvimento de formulações fotoprotetoras e suas associações com rutina (A), succinato de metoxi-PEG-7-rutinila (B) e succinato de rutina (C)	104
Tabela 3 –	Descrição quali- e quantitativa utilizadas no estudo de desenvolvimento (2ª Etapa) de formulações fotoprotetoras contendo rutina associada ou não a filtros solares	105
Tabela 4 –	Descrição quali- e quantitativa utilizadas no estudo de desenvolvimento (3ª Etapa) de formulações fotoprotetoras utilizando em a (Crodafos [®] CES e Uniox [®] C) e b (Hostacerin [®] SAF) incorporando a rutina, o succinato de rutina e o succinato de metoxi-PEG-7-rutinila	106
Tabela 5 –	Descrição quali- e quantitativa utilizadas no estudo de desenvolvimento (4ª Etapa) de formulações fotoprotetoras utilizando em a (Crodafos [®] CES e Uniox [®] C) e b (Hostacerin [®] SAF) incorporando a rutina e o succinato de rutina para o Teste de Estabilidade Acelerada (TEA)	107
Tabela 6 –	Avaliação das características organolépticas das formulações (I a VIII) isoladas (sem letra) e incorporadas com a rutina a 0,1% p/p (A), com o succinato de metoxi-PEG-7-rutinila a 1,0% p/p (B) e com o succinato de rutina a 1,0% p/p (C)	114
Tabela 7 –	Análise dos parâmetros organolépticos (avaliação visual) das formulações fotoprotetoras desenvolvidas (F1 a F22)	120
Tabela 8 –	Avaliação dos parâmetros organolépticos (aspecto, cor e odor) e físico-químico (valor de pH) das formulações-teste fotoprotetoras desenvolvidas na 4ª Etapa após a Avaliação Preliminar de Estabilidade (APE) por meio dos testes de centrifugação e de estresse térmico	122
Tabela 9 –	Avaliação dos parâmetros organolépticos (aspecto, cor e odor) e físico-químico (valor de pH) das formulações-teste fotoprotetoras desenvolvidas com a base cosmética Crodafos [®] CES (a) na 4ª Etapa durante o Teste de Estabilidade Acelerada (TEA)	123
Tabela 10 –	Avaliação dos parâmetros organolépticos (aspecto, cor e odor) e físico-químico (valor de pH) das formulações-teste fotoprotetoras desenvolvidas com a base cosmética Hostacerin [®] SAF (b) na 4ª Etapa durante o Teste de Estabilidade Acelerada (TEA)	125

CAPÍTULO 3. AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA FOTOPROTETORA E COMPORTAMENTO REOLÓGICO

Tabela 1 –	Descrição quali- e quantitativa utilizadas na produção de formulações fotoprotetoras O/A utilizando em A (Crodafo [®] CES e Uniox [®] C) e B (Hostacerin [®] SAF) incorporando o succinato de rutina durante o Teste de Estabilidade Normal (TEN)	173
Tabela 2 –	Avaliação dos parâmetros organolépticos (aspecto, cor e odor) das formulações fotoprotetoras desenvolvidas com as bases cosméticas A (Crodafo [®] CES + Uniox [®] C) e B (Hostacerin [®] SAF) durante o Teste de Estabilidade Normal (TEN)	184
Tabela 3 –	Avaliação do valor de pH das formulações fotoprotetoras desenvolvidas com as bases cosméticas A (Crodafo [®] CES + Uniox [®] C) e B (Hostacerin [®] SAF) durante o Teste de Estabilidade Normal (TEN)	186
Tabela 4 –	Avaliação da viscosidade aparente das formulações fotoprotetoras desenvolvidas com as bases cosméticas A (Crodafo [®] CES + Uniox [®] C) e B (Hostacerin [®] SAF) durante o Teste de Estabilidade Normal (TEN)	189
Tabela 5 –	Avaliação da área de histerese das formulações fotoprotetoras desenvolvidas com a base cosmética A (Crodafo [®] CES + Uniox [®] C) durante o Teste de Estabilidade Normal (TEN)	190
Tabela 6 –	Avaliação da atividade antirradicalar das formulações fotoprotetoras desenvolvidas com as bases cosméticas A (Crodafo [®] CES + Uniox [®] C) e B (Hostacerin [®] SAF) durante o Teste de Estabilidade Normal (TEN)	197
Tabela 7 –	Avaliação da eficácia fotoprotetora → FPS, λ_c , razão UVA/UVB das formulações fotoprotetoras desenvolvidas com as bases cosméticas A (Crodafo [®] CES + Uniox [®] C) e B (Hostacerin [®] SAF) durante o Teste de Estabilidade Normal (TEN)	198

LISTA DE EQUAÇÕES

CAPÍTULO 1. SÍNTESE DO SUCCINATO DE RUTINA E AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA SEGURANÇA

Equação 1.	Coeficiente de partição da rutina ou do succinato de rutina	42
-------------------	---	----

CAPÍTULO 2. EFEITOS DA RADIAÇÃO SOLAR E O DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DE FORMULAÇÕES FOTOPROTETORAS INCORPORADAS DE DERIVADOS DA RUTINA

CAPÍTULO 3. AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA FOTOPROTETORA E COMPORTAMENTO REOLÓGICO

Equação 1.	Determinação do Fator de Proteção Solar <i>in vivo</i>	142
Equação 2.	Determinação do Fator de Proteção em relação à radiação UVA ou da Pigmentação Escurecida e Persistente	144
Equação 3.	Determinação do Fator de Proteção Solar <i>in vitro</i> por análise espectrofotométrica modificada por Mansur <i>et al.</i> , 1986	146
Equação 4.	Determinação do Fator de Proteção Solar <i>in vitro</i> por meio da transmitância difusa com esfera de integração	150
Equação 5.	Determinação do comprimento de onda crítico	152
Equação 6.	Determinação da razão UVA/UVB	153
Equação 7.	Determinação do balanço UVA	157
Equação 8.	Determinação da razão entre o valor do Fator de Proteção Solar e da Pigmentação Escurecida e Persistente	158
Equação 9.	Lei de Newton	164
Equação 10.	Cálculo da porcentagem de inibição do radical DPPH [•]	180

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1. SÍNTESE DO SUCCINATO DE RUTINA E AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA SEGURANÇA

Figura 1.	Síntese do succinato de rutina pela síntese química e enzimática	41
Figura 2.	Metabolização do XTT (sodium 3'-[1-(phenylaminocarbonyl)- 3,4-tetrazolium]-bis (4-methoxy-6-nitro) para o sal solúvel de formazan pelas células viáveis	44
Figura 3.	Efeitos da rutina (A) e do succinato de rutina (B) sobre a viabilidade celular de fibroblastos humanos pelo método de XTT	55
Figura 4.	Efeitos da rutina e do succinato de rutina sobre a viabilidade celular de fibroblastos humanos da linhagem MRC5 (selvagem para reparo de DNA) pelo método de XTT	56

CAPÍTULO 2. EFEITOS DA RADIAÇÃO SOLAR E O DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DE FORMULAÇÕES FOTOPROTETORAS INCORPORADAS DE DERIVADOS DA RUTINA

Figura 2.	Manifestações do fotoenvelhecimento após repetidas exposições à radiação UV em irmãs gêmeas de 50 anos: (a) significativa exposição solar, indicando proeminente enrugamento e (b) comparado com sua irmã que, também foi exposta à radiação UV, porém, fazendo o uso de fotoprotetor	70
Figura 3.	(A) Esquema detalhado da epiderme humana indicando as várias camadas, ressaltando o melanócito. (B) Esquema ampliado da pele humana indicando as espessuras das partes da pele	72
Figura 4.	Estrutura química do ácido urocânico: transformação da forma de <i>trans</i> para <i>cis</i>	72
Figura 5.	Estrutura química do α -tocoferol	73
Figura 6.	Origem dos flavonoides e a representação do esqueleto de carbono C ₆ -C ₃ -C ₆	88
Figura 7.	Reação dos flavonoides como antioxidantes e antirradicais livres	89
Figura 8.	Regiões estruturais dos flavonoides com uma alta atividade de sequestro de radicais livres	89
Figura 9.	Esquema do possível mecanismo de supressão do sistema imunológico e gênese do tumor induzidos pela radiação UVB, por meio da aplicação tópica de polifenóis de chá verde. GTP (polifenóis do chá verde) e ROS (espécies reativas de oxigênio)	91

CAPÍTULO 3. AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA FOTOPROTETORA E COMPORTAMENTO REOLÓGICO

Figura 1.	Aplicação da radiação UV por um simulador solar num sítio delimitado no dorso do voluntário. A fotografia do sítio foi ampliada e mostra padrões de eritema resultantes da dose de radiação UV aplicada	142
Figura 2.	Espalhamento da luz incidente sobre a amostra do fotoprotetor	149
Figura 3.	Geometria difusa/normal ($d/0^\circ$)	149
Figura 4.	Bandas de absorção e comprimentos de onda críticos para os filtros químicos mais usados	151
Figura 5.	Curvas representativas do comportamento de fluxo (A), classificando-os em Newtonianos ou não-Newtonianos e a relação da viscosidade e a taxa de cisalhamento indicada na curva de viscosidade (B)	162

Figura 6.	Reograma indicando o comportamento tixotrópico de um fluido na curva de fluxo ascendente (I) e curva de fluxo descendente (II) formando a área de histerese	163
Figura 7.	A) Curva de fluxo da formulação MS após o período de 90 dias de análise submetida à condição de geladeira ($5,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$), estufa ($45,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$) e de temperatura ambiente ($25,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$). B) Curva de fluxo das formulações S , M e MS obtida em 24 horas após o preparo das formulações (t_0). C) Curva de fluxo genérica para comparar com as obtidas neste estudo e fazer a caracterização	191
Figura 8.	Comportamento reológico tixotrópico das formulações S , M e MS . Os valores de viscosidade aparente foram analisados na velocidade máxima de cisalhamento ($200,0 \text{ s}^{-1}$)	193

CAPÍTULO 1

SÍNTESE DO SUCCINATO DE RUTINA E AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA SEGURANÇA

1 RESUMO

Existe a tendência atual do mercado farmacêutico e cosmético no desenvolvimento de produtos que contêm insumos de origem vegetal oriundos da biodiversidade brasileira. Neste contexto, o principal objetivo deste trabalho envolveu o desenvolvimento do conceito tecnológico da *química verde* aplicada na promoção do aumento da estabilidade da rutina em formulações cosméticas e, também, de sua eficácia antioxidante e fotoprotetora. Realizou-se a síntese por meio da introdução de grupos carboxilatos nos grupamentos hidroxilas do dissacarídeo da molécula de rutina, gerando como, produto final o succinato de rutina. Esta síntese foi realizada por duas vias: **(a) química** – sem uso de catalisador e **(b) enzimática** – utilizando a lipase imobilizada *Candida antarctica*. A primeira técnica **(a)** permitiu a reutilização do solvente nas etapas de síntese, não utilização de catalisadores de custo elevado, vidrarias acessíveis e gasto de energia mínimo. A segunda, **(b)** promoveu especificidade reacional maior e, também, por facilitar a etapa de purificação do produto final. Os produtos sintetizados em ambas as sínteses tiveram suas estruturas químicas elucidadas por meio da técnica de Ressonância Magnética Nuclear (espectro de ^{13}C -RMN e ^1H -RMN). A análise do rendimento e das posições substituídas nas sínteses apresentadas resultou em: **(a)** 85% e seis posições de substituições e **(b)** 5-15% e máximo de duas posições de substituições, respectivamente. Optou-se pela síntese química por obter maior rendimento no produto formado e permitir melhor planejamento em relação à quantidade necessária para ser incorporado em formulações fotoprotetoras (**Capítulo 2**). A solubilidade em água do succinato de rutina (10g/L e $\log P$ $-1,13 \pm 0,02$) apresentou-se em torno de 80 vezes maior que da rutina (0,125g/L e $\log P$ $0,85 \pm 0,05$), sendo este dado importante para a análise posterior de sua estabilidade em emulsões fotoprotetoras. Outra preocupação que ocorreu neste trabalho foi a avaliação da segurança da molécula do succinato de rutina em comparação com a rutina, utilizando a alternativa de ensaio de toxicidade o método *in vitro* XTT. Após o *screening* das concentrações da rutina e do succinato de rutina que variaram de 250 a 0,0625 mg/mL, foi observado que as concentrações de 0,4% (4 mg/mL) para o succinato de rutina e 0,1% (1 mg/mL) para a rutina foram aquelas com menor morte celular (-12,8% e 3,8%, respectivamente) e, portanto, podem ser incorporadas em formulações cosméticas de uma forma que promova segurança ao usuário.

Palavras-chaves: química verde, succinato de rutina, ensaio de toxicidade *in vitro*

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Plantas medicinais no Brasil e a pesquisa

O Brasil possui uma área de 8.514.877 km², com várias zonas climáticas (trópico úmido, semi-árido e áreas temperadas) e abriga seis biomas, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2010). A maior floresta tropical úmida (Floresta Amazônica) e a maior planície inundável (o Pantanal) do mundo se encontram nesses biomas, além do Cerrado (savanas e bosques), da Caatinga (florestas semi-áridas), da Mata Atlântica (floresta tropical pluvial) e do Pampa (dominado por gramíneas e poucas árvores) considerando adicionalmente a costa marinha de 3,5 milhões de km² com uma variedade de ecossistemas (recifes de corais, dunas, manguezais, entre outras). Com toda esta variedade de espécies da fauna e principalmente da flora, a pesquisa relacionada com produtos naturais teve um crescimento acelerado nos últimos anos aqui no país (IBGE, 2010; PINTO *et al.*, 2002). O Brasil possui a maior base universitária e técnica da América do Sul, e uma massa crítica para atuar nessa nova realidade de pesquisa, com participação em torno de 7% na publicação de artigos em revistas representativas para divulgação de trabalhos realizados nos cinco continentes, como a *Phytochemistry* e a *Journal Natural Products*. Estas publicações têm a grande participação dos países da Europa, Estados Unidos, China e Japão.

Além disso, o pesquisador brasileiro, em torno de 70 grupos lidando com produtos naturais e especializados em química e farmacologia, vem tomando consciência do valor do potencial da biodiversidade brasileira, que consta com 55 mil espécies vegetais em território nacional (22% do total registrado no planeta) (GURIB-FAKIM *et al.*, 2006). Só um trabalho científico integrado de todos os grupos existentes no país poderá num tempo limite, propiciar o conhecimento real da diversidade química dos ambientes tropicais e auxiliar nos estudos futuros sobre o perfil metabólico (metaboloma) e associações com perfil macromolecular (proteoma) das espécies de interesse de nossa biota.

Neste contexto, as pesquisas com plantas medicinais envolvem investigações da medicina tradicional e popular (etnobotânica); isolamento, purificação e caracterização de princípios ativos (química orgânica: fitoquímica); investigação farmacológica de extratos e dos constituintes químicos isolados (farmacologia); transformações químicas e princípios ativos (química orgânica sintética); estudo da relação estrutura/atividade e dos mecanismos de ação dos princípios ativos (farmacognosia) e, finalmente, a operação de formulações para a

produção de fitoterápicos. A integração destas áreas na pesquisa de plantas medicinais conduz a um caminho promissor e eficaz para descobertas de novos princípios ativos medicamentosos ou cosméticos (ALLEGRETTI, 1990; GURIB-FAKIM *et al.*, 2006; MENDELSON; BALICK, 1997; MOREIRA *et al.*, 2006).

A partir das informações citadas, existe a tendência atual do mercado farmacêutico e cosmético no desenvolvimento de produtos que agreguem insumos de origem vegetal oriundos da biodiversidade brasileira.

As indústrias farmacêuticas procuram modelos na natureza ou a identificação de princípios ativos (*templates*) que lhes permitam utilizar como ponto de partida para o desenho de drogas (síntese) e não a utilização direta de plantas medicinais. Com as novas técnicas biotecnológicas, existem chances de aumento de investigações das plantas medicinais com propriedades terapêuticas em relação aos 10% existentes das 250.000 espécies de plantas no mundo. Segundo Gurib-Fakim e colaboradores (2006) calcula-se que existam em torno de 375 drogas potenciais em florestas tropicais, e dentre estas, foram investigadas algumas, como a vincristina, quinina, curare, codeína e pilocarpina (GURIB-FAKIM *et al.*, 2006; MENDELSON; BALICK, 1997; MOREIRA *et al.*, 2006).

Com este trabalho exaustivo, existe a participação de 125 das maiores empresas farmacêuticas mundiais que não tinham qualquer projeto com plantas medicinais estão agora empenhadas em pesquisas nessa área (GURIB-FAKIM *et al.*, 2006; MOREIRA *et al.*, 2006). Como exemplo, há a empresa farmacêutica Merck, muito importante em produtos naturais do país, a qual possui plantações próprias de jaborandi e de fava d'anta para extração da pilocarpina e rutina, sendo comercializadas como substâncias puras principalmente no mercado externo. Porém, os produtos naturais representam apenas 20% das vendas da empresa (MOREIRA *et al.*, 2006).

Nas últimas décadas, as atividades farmacológicas da rutina que é um bioflavonóide pertencente ao sub-grupo dos flavonóis têm sido intensamente pesquisadas e os seus resultados estão interessando constantemente as indústrias farmacêuticas. O interesse em utilizar a rutina em formulações cosméticas e farmacêuticas é cada vez maior, devido às suas propriedades antioxidantes, e vasoprotetoras, promovendo uma melhora nos sintomas de insuficiência dos vasos linfáticos e venosos, diminuindo a fragilidade capilar. Em função destas características e pela sua baixa solubilidade em água (0,125g/L) limitando o seu uso, neste trabalho desenvolveu-se uma tecnologia de síntese com modificações químicas nos grupamentos glicosídicos da molécula de rutina, visando aumentar a sua solubilidade em

água. E sua principal aplicação seria em formas farmacêuticas para uso externo (cremes, géis e loções) mantendo as propriedades farmacológicas, como a atividade antioxidante por exemplo, da rutina de partida.

A tecnologia descrita neste trabalho aplicada para o aumento da solubilidade em água da rutina fundamentou-se no trabalho de um grupo de pesquisa francês formado por Alluis, Pérol, El hajji e Dangles (2000), que enfocaram a síntese de derivados hidrossolúveis de rutina introduzindo grupos carboxilatos e sulfatos nas hidroxilas dos grupamentos glicosídicos utilizando várias concentrações de anidrido succínico utilizando como catalisador o DMAP (N,N-dimetilpiridin-4-amina) e como solvente a piridina a 70 °C, sem promover acilação nas hidroxilas do anel flavonóide nestas condições.

A Indústria Brasileira de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos apresentou um crescimento médio deflacionado composto de 10,5% nos últimos 15 anos, tendo passado de um faturamento “ExFactory”, líquido de imposto sobre vendas, de R\$ 4,9 bilhões em 1996 para R\$ 27,3 bilhões em 2010, sendo que há uma mudança estratégica técnico-competitiva agregando novos nichos de mercado abertos pelos produtos naturais, utilizando o potencial da biodiversidade brasileira. Existem no Brasil 1.659 empresas atuando no mercado de produtos de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos, sendo que 20 empresas de grande porte, com faturamento líquido de impostos acima dos R\$ 100 milhões, representam 73,0% do faturamento total. A maior distribuição das empresas está concentrada na região Sudeste com 63% seguida da região Sul com 19% (ABIHPEC, 2010).

Com todo este desenvolvimento e pesquisa quanto aos produtos naturais tanto da indústria farmacêutica quanto cosmética, a questão ambiental passou a fazer parte das estratégias do *marketing verde*. Elas têm sido fortemente pressionadas pela comunidade internacional, por organizações não governamentais (ONGs), clientes e consumidores, órgãos públicos e por diversas regulamentações, entre outros, a modificarem suas posturas referentes à conservação e ao uso racional da utilização dos recursos naturais e no tratamento e disposição de resíduos (MOREIRA *et al.*, 2006).

Práticas mais adequadas de exploração da biodiversidade, como o manejo sustentável, adoção de “selos verdes”, acesso legal aos recursos naturais e participação de benefícios com a comunidade local - detentora do conhecimento. Estes são temas cada vez mais recorrentes na agenda de diferentes organizações, mesmo aquelas do setor produtivo. Muitas dessas empresas desenvolvem projetos junto às comunidades locais, constituindo parcerias para, por exemplo, realizar a extração da matéria-prima e constituir unidades de beneficiamento de

óleos, ou unidades de exploração de produtos, como castanha-do-pará, copaíba, andiroba, buriti, entre outros (GURIB-FAKIM *et al.*, 2006; MOREIRA *et al.*, 2006).

2.2 Química Verde e a relação produtiva

A Química Orgânica deixou de entender somente a forma e a função das moléculas e sua interação. Na realidade atual, essa área vem recebendo contribuições importantes da catálise, biotecnologia, ciência dos materiais, genética química, química farmacêutica, química ambiental, nanotecnologia, biologia, genômica e conhecimento molecular. A preocupação da Síntese Orgânica vem se voltando para a necessidade de mudança para um novo paradigma, onde a eficiência do processo químico deve estar baseada também em valores ambientais. É necessário o uso de conhecimentos químicos para se prevenir a poluição ambiental, seja por meio do planejamento de processos químicos, seja por meio do tratamento adequado dos resíduos gerados (CORREIA *et al.*, 2002).

Desde o início da década de 90, existe uma nova tendência de abordar as questões relacionadas à produção e tratamento de resíduos químicos e à redução do impacto da atividade química ao ambiente. Este processo vem sendo chamado de *green chemistry* (química verde, química limpa, química ambientalmente benigna ou química auto-sustentável) (International IUPAC Conference on Green Chemistry, 2010; LENARDÃO *et al.*, 2003).

Dentro deste novo contexto, a racionalização do processo e a economia de átomos (*atom economy*) devem ser consideradas como elementos quase tão importantes quanto o rendimento químico puro e simples, além de mudanças como:

- (a) eliminação de solventes agressivos e o uso de reações catalíticas;
- (b) utilização de reações em fase sólida;
- (c) emprego de biocatalises;
- (d) redução de resíduos;
- (e) novos processos de separação;
- (f) uso de biomassas renováveis;
- (g) aproveitamento de líquidos iônicos;
- (h) reações em sistemas bifásicos;
- (i) integração de processos;
- (j) educação dos profissionais em química ambiental.

Enfim, a prevenção da formação de rejeitos deve ganhar mais prioridade em processos industriais, pois a ação de remoção e/ou eliminação desses resíduos é dispendiosa (CORREIA *et al.*, 2002; International IUPAC Conference on Green Chemistry, 2010).

Um dos enfoques discutido com mais ênfase que vem se apresentando como uma opção interessante para sua exploração em síntese orgânica é o biotecnológico ou biotransformação, principalmente, quando são consideradas algumas das vantagens, tais como (CASTRO *et al.*, 1997):

- 1) maior rendimento do processo;
- 2) obtenção de produtos biodegradáveis;
- 3) menor consumo de energia;
- 4) redução da quantidade de resíduos.

Os catalisadores usados em processos de biotransformação são as enzimas isoladas ou purificadas, extremamente ativas, versáteis, possuem baixo custo, realizam uma variedade de transformações sob condições brandas e de maneira seletiva e não precisam de cofatores. Diferentemente, atuam os catalisadores químicos que são pouco versáteis e exigem temperaturas elevadas para atingir razoável velocidade de reação. Além disso, possuem baixa especificidade, geralmente fornecem produtos de composição química mista ou contaminados que requerem uma etapa posterior de purificação (CASTRO; ANDERSON, 1995; GAO *et al.*, 2001; RIVA, 2002).

Esta preocupação crescente não ocorre apenas no mercado industrial mas, também, no meio acadêmico por meio de textos publicados em livros, periódicos e diretamente divulgados na Internet. Em 2000, a IUPAC publicou números especiais da revista *Pure and Applied Chemistry* dedicados à química verde (TUNDO *et al.*, 2000). A Sociedade Real de Química Britânica (UK Royal Society of Chemistry - RSC) lançou o periódico bimestral *Green Chemistry*, que publica artigos descrevendo aspectos químicos de tecnologias limpas (RSC Publishing, 2010).

Apesar das vantagens expostas, a aplicação de enzimas em síntese orgânica é, ainda, restrita a um grupo reduzido como as hidrolases (especificamente as esterases, lipases e proteases) (CASTRO; ANDERSON, 1995).

A função das lipases é catalisar a hidrólise de glicerídeos e outros ésteres graxos; contudo, essas reações são facilmente reversíveis. Consequentemente, estas enzimas são excelentes catalisadores, para um amplo número de reações de esterificação e

transesterificação. Entretanto, para sua aplicação industrial, existem alguns fatores que podem influenciar na especificidade da lipase ou conseqüentemente no rendimento da reação, entre eles:

(a) tamanho da cadeia das moléculas ácidas ou alcoólicas dos substratos → o ácido acético é considerado inibidor do mecanismo enzimático da lipase, porém os ácidos de cadeias alifáticas contendo 4 ou mais carbonos são considerados excelentes substituintes no grupo acila, fornecendo taxas de esterificação entre 95 a 98% (RIVA, 2002);

(b) sua aplicação em reações de esterificação de álcoois secundários e terciários é limitado, sendo indicado o uso das lipases em sínteses de ésteres terpenoides, empregando álcoois primários (CASTRO; ANDERSON, 1995).

2.3 Testes alternativos para a avaliação da segurança

O produto cosmético deve ser seguro para o usuário nas condições normais ou razoavelmente previsíveis de seu uso. Isto significa que os princípios ativos devem ser incorporados na composição do produto cosmético num nível de concentração que apresente uma margem de segurança adequada, sendo avaliada pelos testes de toxicidade (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003; BRASIL, 1996).

Durante as décadas de 1970 e 1980, houve uma pressão política exercida por setores ativistas na luta em defesa dos direitos dos animais que gerou grande impacto na pesquisa científica (farmacêutica e cosmética) e, conseqüentemente, o envolvimento de implicações éticas para a não utilização de animais nestas pesquisas e a mobilização de várias entidades e Órgãos Regulamentadores. Estas décadas tiveram a discussão de temas, tais como: meios para reduzir tanto o número de animais de laboratório utilizados por experimento, número de experimentos realizados e substituição da experimentação animal por metodologias alternativas *in vitro* (PRESGRAVE, 2002; RAIMUNDO; GOLDIM, 2002).

Um movimento neste sentido ocorria desde 1959, porém um novo conceito evoluiu como uma tendência mundial durante os anos seguintes, onde Willian Russel e Rex Burch apresentaram à comunidade científica o livro *Principles of Human Experimental Technique*, definindo os 3R's, cuja sigla significa o que se segue (PRESGRAVE, 2002; STEPHENS *et al.*, 2001):

(1) **refinamento (*refinement*)** - modificação de algum procedimento operacional com animais, objetivando minimizar a dor e/ou o estresse, que podem resultar mudanças

psicológicas que interferem nos resultados obtidos. Sendo assim, o interesse dos cientistas é assegurar que as condições ambientais para os animais sejam as melhores possíveis;

(2) **redução (*reduction*)** – otimização do número de animais para obter a mesma qualidade de informação, ou maximização da informação obtida, utilizando-se o mesmo número de animais utilizados no teste clássico;

(3) **substituição (*replacement*)** - dos testes *in vivo* por testes *in vitro*.

A primeira publicação oficial sobre a aplicação dos 3R's surgiu em meados de 1980, quando foi criada na Europa a Directiva 86/906/EEC que descreve as leis que regem a proteção de animais usados em experimentação científica. Como resultado deste processo pode-se observar, em alguns países, a diminuição significativa do número de animais utilizados em pesquisa científica. Na Alemanha, por exemplo, após a fundação do ZEBET em 1989, o número de animais de laboratório utilizados anualmente diminuiu de 2,7 (1989) para 1,6 milhões (1999) principalmente no desenvolvimento de novos fármacos.

Os estudos alternativos são realizados em micro-organismos, células, tecidos e/ou órgãos de animais ou humanos, obtendo-se resultados úteis no que se refere aos sistemas biológicos simples. Por exemplo, em uma população celular relativamente bem definida, como: queratinócitos, melanócitos, células de Langerhans, fibroblastos e glândulas sebáceas pode ser isolada da pele humana e utilizada para testes de atividade biológica de vários compostos medicamentosos ou cosméticos. Cada linhagem celular é caracterizada em função de sua morfologia e função (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003; FRESHNEY, 2005; STEPHENS *et al.*, 2001).

Existe a dificuldade no emprego de tais métodos alternativos, no que se diz respeito à avaliação da reatividade de sistemas mais complexos (risco toxicológico). A toxicidade é um evento complexo *in vitro*, quando ocorrer dano celular direto, como no caso de princípios ativos anticancerígenos citotóxicos; efeitos fisiológicos, como o transporte pela membrana do rim ou a neurotoxicidade cerebral; efeitos inflamatórios, tanto no local de aplicação como em outros locais e outros efeitos sistêmicos. É difícil monitorar efeitos sistêmicos e fisiológicos *in vitro* assim, a maioria dos testes determina os efeitos em nível celular, ou seja, a citotoxicidade (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003; FRESHNEY, 2005; LIEBSCH; SPIELMANN, 2002). As definições de citotoxicidade variam, dependendo da natureza do estudo e se as células morreram ou apenas tiveram seu metabolismo alterado. Enquanto um agente anticancerígeno deve matar as células cancerígenas, demonstrações de atoxicidade de outros princípios ativos podem requerer uma

análise mais sutil das mínimas alterações metabólicas ou modificações dos sinais célula-célula, como os fornecidos por uma inflamação ou resposta alérgica (FRESHNEY, 2005; LIEBSCH; SPIELMANN, 2002).

Embora os testes *in vitro* não possam substituir completamente os testes *in vivo*, eles fornecem informações úteis quanto aos aspectos que influenciam o crescimento ou a sobrevivência celular. Para tanto, a escolha apropriada do teste é de fundamental importância, dependendo da substância a ser estudada e da cultura celular empregada e portanto, devem ser validados de acordo com os procedimentos internacionais na área de aplicação para que sejam reconhecidos pelo meio científico e pelos Órgãos Regulamentadores. Também, torna-se necessário o acesso a outros testes complementares, de maneira que o conjunto destes ofereça um resultado com os mesmos níveis científicos e de informação, em relação aos obtidos, anteriormente, com os modelos em animais (LIEBSCH; SPIELMANN, 2002; PRESGRAVE, 2002).

O processo de desenvolvimento de validação de novos métodos alternativos é exaustivo e requer grande investimento de tempo, dinheiro e pessoal capacitado. Assim, alguns países, percebendo a complexidade de tal processo, se organizaram e criaram centros de pesquisa e de fomento para o desenvolvimento e validação de metodologias alternativas ao uso de animais, como é o caso do *European Centre for Validation of Alternative Methods* (ECVAM) em Ispra na Itália, o *Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods* (ICCVAM) nos EUA, o *Japanese Center for the Validation of Alternative Methods* (JACVAM) no Japão, o *Fund for Replacement of Animal Medical Experiments* (FRAME) na Inglaterra e o *Centre for Documentation and Evaluation of Alternatives to Animal Experiments* (ZEBET) na Alemanha. Além de algumas instituições, como CTFA - *Cosmetic, Toiletries and Frangrance Association*, IRAG - *Interagency Regulatory Alternatives Group*, FDA - *Food and Drug Administration e Alternatives to Animal Testing*, John Hopkins University, Baltimore - USA, que são referências para acelerar a padronização e a harmonização de metodologias (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003; KNOX *et al.*, 1986).

Dentre os principais objetivos destes centros de estudos, destacam-se: (a) desenvolvimento de novos métodos alternativos em consonância com o princípio dos 3R's; (b) estabelecimento da base de dados sobre métodos alternativos ao uso de animais; (c) fomento de projetos de pesquisa relacionados aos métodos alternativos e a cooperações com outras agências de fomento nacionais e internacionais e centros de validação; (d) coordenação

de estudos interlaboratoriais de validação; e por fim, (e) promoção de fóruns de discussão sobre métodos alternativos ao uso de animais (STEPHENS *et al.*, 2001).

Como resultado deste esforço mundial no desenvolvimento/validação de metodologias alternativas, em 2002 existia um número considerável de ensaios validados e aceitos para fins regulatórios. Tais métodos foram aplicáveis ao controle da qualidade de produtos sujeitos à ação da Vigilância Sanitária e, via de regra, apresentavam boa especificidade, sensibilidade e precisão. Além disso, foram considerados vantajosos quando comparados aos ensaios *in vivo* que pretendem substituir, pelas questões éticas envolvidas no uso de animais, maior rapidez de resposta, menor custo e maior facilidade de disseminação para outros laboratórios de saúde pública (laboratórios centrais de Saúde Pública - LACENS, Laboratórios da Rede Brasileira de Laboratórios Analíticos em Saúde - REBLAS e universidades) (PRESGRAVE, 2002).

Alguns exemplos de metodologias alternativas validadas/aceitas para fins regulatórios na Europa são:

- (I) **Teste de pirogênio *in vitro* (LAL)** – pirogenicidade mediada por endotoxinas de origem bacteriana (Gram Negativa), utiliza um modelo de ensaio “gel-clot” que é uma gelificação de amebócitos sanguíneos de carangueijo *Limulus* → substituição do Teste de Pirogênio em coelhos e consta na Farmacopeia Americana;
- (II) **Ensaio de Fototoxicidade (3T3-NRU)** – potencial fototóxico de ingredientes de produtos preconizados para pele humana (exposição à luz solar), sendo utilizada uma linhagem celular 3T3 e o corante Vermelho Neutro → substituição do Teste de Toxicidade *in vivo* (cobaias) e que foi validado em 1998 (DIRECTIVE 2000/33/EU for the 21st Amendment of Annex V of the EU Directive 86/906/EEC; DIRECTIVE 2003/15/EEC).

No processo de avaliação da segurança de produtos cosméticos na União Europeia, existe uma divisão entre a avaliação da segurança dos ingredientes contidos nos Anexos III, IV, VI, VII da Directiva Cosmética 76/768/EEC e entre aqueles presentes nos produtos acabados, de acordo com o estabelecido na 6ª Emenda (DIRECTIVE 93/35/EEC). A primeira Directiva é tratada pelo SCCP (*Scientific Committee on Consumer Products*) e a segunda, pelos avaliadores de segurança. Na questão específica do controle da qualidade de cosméticos, esta situação gera um importante impasse, que dificulta muito a exportação de nossos produtos para outros países. Isto porque, apesar da proibição da realização dos testes em animais serem uma tendência mundial, ainda não existe uma legislação em vigência no

Brasil. Segundo o Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos é ressaltado que o “rigor científico e a ética são princípios que devem nortear a utilização de animais em testes de segurança e deverão ser utilizados sempre que não existam métodos alternativos validados que os substituam ou, em casos específicos, após *screening* com métodos *in vitro* e/ou matemáticos válidos, precedendo dessa forma, os estudos clínicos” (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003).

No entanto, a Europa proíbe desde 2004 a comercialização de produtos acabados testados em animais e havia estabelecido um prazo até 2009 para a proibição definitiva do uso de animais na avaliação de segurança de ingredientes isolados (por exemplo, tensoativos) e, conseqüentemente, deveria ocorrer validação dos ensaios alternativos substitutos aos testes em cosméticos nos países membros da Comunidade Econômica Europeia, entre eles estão os testes dos efeitos tóxicos induzidos pela radiação ultravioleta (UV) e fototoxicidade aguda (B41 Annex V DIRECTIVE 67/548/EEC).

No último Relatório da Comissão dos Estados-Membros da Europa ao Parlamento e ao Conselho em Bruxelas em setembro de 2010, sobre o Desenvolvimento, a Validação e a Aceitação Legal de Métodos Alternativos aos Ensaios em Animais no Domínio dos Produtos Cosméticos foi divulgado algumas atualizações sobre o assunto, entre elas:

(a) proibição de realizar ensaios de produtos cosméticos acabados em animais, em vigor desde 11 de setembro de 2004 (DIRECTIVE 2003/15/EC);

(b) proibição no caso dos ingredientes isolados ou associados aplicada desde 11 de março de 2009, independentemente da disponibilidade de ensaios alternativos sem recurso a animais;

(c) os únicos ensaios que ainda está permitida a realização em animais (até 11 de março de 2013) são: toxicidade de dose repetida, fotoalergia, toxicidade crônica, toxicidade aguda cutânea e por inalação, toxicidade sistêmica, toxicidade reprodutiva e toxicocinética;

(d) a Comissão deverá estudar se, por razões técnicas, um ou mais ensaios cobertos pela data-limite de 2013 não serão realizados e validados antes de Março de 2013;

(e) dos 27 Estados-Membros que transmitiram informações sobre ensaios em animais para avaliar a segurança dos produtos cosméticos, apenas a França e a Espanha os realizaram num total de 1818 animais em 2007 e 1510 animais em 2008;

(f) a Comissão se mostrou preocupada com os dados fornecidos pelos outros 25 Estados-Membros que alegam não terem realizado ensaios em animais em seus ingredientes cosméticos associados e em seu produto final;

(g) houve colaboração entre a indústria, os meios acadêmicos, a Comissão Europeia e os três órgãos de validação de métodos alternativos, entre eles, da Europa (ECVAM), dos Estados Unidos (ICCVAM) e do Japão (JACVAM) para validar um sistema de ensaio do metabolismo *in vitro* eficaz como reatividade peptídica, desreguladores endócrinos e em ensaios de toxicidade reprodutiva, visando cumprir os prazos estabelecidos. Também existe apoio do Canadá e da China nas questões envolvendo testes em animais;

(h) A COLIPA apresentou um importante programa de investigação sobre as abordagens alternativas aos ensaios em animais, como exemplo, na avaliação de irritação ocular houve a otimização dos dois modelos mais avançados de tecido humano reconstituído, ensaios de genotoxicidade em pele humana em 3D, apresentados em 2008 ao ECVAM.

Como conclusão das Comissões envolvidas, a meta até março de 2013 ainda continua sendo um grande desafio e, no que diz respeito às substâncias ativas associadas presentes nos cosméticos, a substituição dos ensaios de irritação ocular e toxicidade aguda, além de métodos alternativos em relação aos parâmetros toxicológicos complexos continua a ser cientificamente difícil, apesar dos esforços suplementares significativos que estão sendo realizados a vários níveis.

A literatura científica que norteiou os itens abordados deste Relatório estão relacionadas a seguir: (I) Regulamento (CE) nº 440/2008 da Comissão; (II) Regulamento (CE) nº 1223/2009 do Parlamento Europeu e do Conselho; (III) Regulamento (CE) nº 761/2009 da Comissão.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Síntese comparativa entre a via química e a enzimática obtida por tecnologia verde, determinação estrutural, caracterização da solubilidade e avaliação da segurança *in vitro* do succinato de rutina.

3.2 Específicos

(a) Síntese química do succinato de rutina pela acilação dos grupamentos glicosídeos da molécula da rutina obtida por uma *tecnologia verde* e purificação por Cromatografia em Coluna de Polivinilpirrolidona (PVPP);

- (b) Determinação estrutural do succinato de rutina por meio da técnica de Ressonância Magnética Nuclear (espectro de ^{13}C -RMN e ^1H -RMN);
- (c) Promoção da síntese enzimática regiosseletiva alternativa utilizando a lipase imobilizada da *Candida antarctica*;
- (d) Caracterização do succinato de rutina, envolvendo coeficiente de partição octanol-água ($\log P$) e solubilidade em solventes apróticos e próticos;
- (e) Avaliação da segurança *in vitro* do succinato de rutina envolvendo fibroblastos humanos.

4 METODOLOGIA

4.1 Material

4.1.1 Princípio ativo (Grau de pureza farmacêutico)

- ✓ Rutina (98,8%): Natural Pharma, Brasil

4.1.2 Reagentes (Grau de pureza analítico - PA)

- ✓ 1-octanol: Labsynth, Brasil
- ✓ Acetato de etila: Labsynth, Brasil
- ✓ Acetona: Labsynth, Brasil
- ✓ Acetonitrila: Labsynth, Brasil
- ✓ Ácido acético: Labsynth, Brasil
- ✓ Álcool etílico absoluto: Labsynth, Brasil
- ✓ Anidrido succínico: Sigma Chemical, Estados Unidos
- ✓ Butanol: Labsynth, Brasil
- ✓ Cloreto de potássio (KCl): Merck, Estados Unidos
- ✓ Cloreto de sódio (NaCl): Merck, Estados Unidos
- ✓ Clorofórmio: Labsynth, Brasil
- ✓ Éter dietílico: Labsynth, Brasil
- ✓ Fibroblastos humanos da linhagem MRC5 (selvagem para reparo de DNA): MRC Harwell (Medical Research Council), Inglaterra
- ✓ Fosfato dibásico de sódio (Na_2HPO_4): Merck, Estados Unidos
- ✓ Fosfato monobásico de sódio monoidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$): Merck, Estados Unidos
- ✓ Glicerina: Labsynth, Brasil

- ✓ Hexano: Labsynth, Brasil
- ✓ Hidrogenofosfato de potássio ($\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$): Merck, Estados Unidos
- ✓ Lipase imobilizada *Candida antarctica* (Novozym[®] 435): Sigma Chemical, Estados Unidos
- ✓ Meio de cultura Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM): Invitrogen, Estados Unidos
- ✓ Metanol: Labsynth, Brasil
- ✓ N,N-dimetilformamida (DMF): Labsynth, Brasil
- ✓ Piridina: Labsynth, Brasil
- ✓ Polivinilpolipirrolidona (PVPP): Sigma Chemical, Estados Unidos
- ✓ Soro fetal bovino (FCS): Cultilab, Brasil
- ✓ Terc-butanol: Labsynth, Brasil
- ✓ Tolueno: Labsynth, Brasil
- ✓ Tripsina-EDTA 0,25%: StemCell Technologies, Canadá
- ✓ XTT (sodium 3'-[1-(phenylaminocarbonyl)- 3,4-tetrazolium]-bis (4-methoxy-6-nitro) benzene sulfonic acid hydrate) (*Kit Cell Proliferation II*[®]) e MIX XTT (50 de XTT *labeling reagent* : 1 de *Electron-coupling reagent*): Roche Diagnostics GmbH, Alemanha

4.1.3 Equipamentos e acessórios

- ✓ Agitador magnético 713D: Fisatom, Brasil
- ✓ Balança analítica 205A SCS com precisão de 0,0001g: Precisa, Inglaterra
- ✓ Balança Semi-Analítica LC1: Marte, Brasil
- ✓ Centrífuga refrigerada CR20-B2: Hitachi, Japão
- ✓ Cromatofolha de alumínio (sílica gel 60 F₂₅₄): Merck, Estados Unidos
- ✓ Dessecador a pressão reduzida EP-51-30233 – 240 mm, EasyPath, Brasil
- ✓ Espectrofotômetro *multiwell* – Leitor de Elisa (Glo-Max[®] Multi Detection System): Promega Corporation, Estados Unidos
- ✓ Espectrofotômetro TCC – 240A UV-Vis, com cubeta de quartzo com 1 cm de caminho óptico: Shimadzu, Japão
- ✓ Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) – instrumento ADVANCE DRX – 500 operando a 500,13 MHz, incluindo (a) sinais de ¹H (experimentos 1D e 2D-COSY) e (b) sinais de ¹³C (experimentos 1D, 2D-COSY e HETERO-COSY): Bruker BioSpin, Alemanha

- ✓ Estufa para secagem e esterilização MA033: Marconi, Brasil
- ✓ Evaporador rotativo 802A: Fisatom, Brasil
- ✓ Filtro para seringa com membrana poliestersulfônica 0,22 μm (diâmetro de 33 mm): TPP 99722, Estados Unidos
- ✓ Frascos com filtro para cultura (garrafa) tecido, capacidade 690 mL, área de crescimento 150 cm^2 : TPP90151, USA
- ✓ Micropipeta monocal Fixo VF-250: SP Labor, Brasil
- ✓ Papel cromatográfico preparativo (PC Whatman 3MM, 46 X 57 cm): Whatman, Inglaterra
- ✓ Peagômetro Q400AS: Quimis, Brasil
- ✓ Placa cultura de tecidos, fundo chato 96 poços: TPP92006, Estados Unidos
- ✓ Placas de cultura celular *multiwell* com 6 poços (35 mm): TPP92006, Estados Unidos
- ✓ Programa MestreNova 5.0.1 (2007): Mestre Lab Research, Estados Unidos
- ✓ Programa Statistica 7.0: StatSoft Inc. South América, Estados Unidos

4.2 Métodos

4.2.1 Síntese química, purificação, determinação estrutural e identificação do succinato de rutina

Foram pesados em balança analítica exatamente 20,0 g de rutina (32,8 mmol) e exatamente 30,0 g de anidrido succínico (299,76 mmol) em N,N-dimetilformamida (exatamente 800,0 mL) foi aquecida a 70° C, por 24 horas (**Figura 1 - 2a**). O solvente foi removido por destilação em baixa pressão e o produto residual foi solubilizado em metanol. A primeira tentativa de identificar o produto de síntese formado foi realizada por meio da Cromatografia de Camada Delgada (CCD) em sílica gel 60F₂₅₄, usando como eluentes: acetato de etila/acetona/ácido acético/água (20:2:1:1, v/v/v/v). Sua separação foi realizada, primeiramente, por meio de papel cromatográfico preparativo (Whatman 3MM, 46 X 57 cm) com fase móvel composta por acetato de etila/acetona/ácido acético/água (20:2:1:1, v/v/v/v) e, sequencialmente, pela Cromatografia em Coluna (CC) de Polivinilpolipirrolidona (PVPP), tendo como eluente metanol (ALLUIS *et al.*, 2000; PEDRIALI, 2005; PEDRIALI *et al.*, 2008). O estudo colaborativo da purificação do material sintetizado foi realizado com o Instituto de Biociências - Departamento de Sistemática Química e Molecular (Prof. Dr. Antonio Salatino).

4.2.2 Síntese alternativa enzimática

Após o estudo criterioso dos trabalhos atuais descritos na literatura foram realizadas sínteses químicas com diversas variações de condições experimentais (XIAO *et al.*, 2005; ARDHAOUI *et al.*, 2004(a); ARDHAOUI *et al.*, 2004(b); PASSICOS *et al.*, 2004; KONTOGIANNI *et al.*, 2003; DANIELI *et al.*, 1997).

As matérias-primas foram pesadas em balança analítica, exatamente 30,0 mg de rutina (0,049 mmol); exatamente 60,0 mg de anidrido succínico (0,60 mmol); exatamente 15,0 mg da lipase imobilizada da *Candida antarctica* (Novozym 435®) em, exatamente, 5 mL de diversos solventes como segue e descritos na **Figura 1**: **(2b)** acetona + 20% (v/v) piridina; **(2c)** terc-butanol + 20% (v/v) piridina; **(2d)** acetona + DMF (3:1 v/v); **(2e)** acetona; **(2f)** terc-butanol. A razão molar rutina/anidrido succínico foi 1/12. Os meios reacionais foram agitados a 250 rpm por 48 horas à temperatura de 25°C. Posteriormente, a enzima foi filtrada e o filtrado foi concentrado por destilação em baixa pressão (XIAO *et al.*, 2005).

A rutina foi pesada exatamente 30,0 mg (0,049 mmol); o anidrido succínico foi pesado exatamente 30,0 mg (0,3 mmol) e exatamente 6,0 mg da lipase imobilizada da *Candida antarctica* (Novozym 435®) em, exatamente, 5 mL de diversos solventes como segue e descritos na **Figura 1**: **(2g)** acetona + 20% (v/v) piridina; **(2h)** terc-butanol + 20% (v/v) piridina. A razão molar rutina/anidrido succínico foi 1/6. Num segundo momento, a rutina foi pesada exatamente 30,0 mg (0,049 mmol); o ácido succínico foi pesado exatamente 60,0 mg (0,60 mmol) e exatamente 5,0 mg da lipase imobilizada da *Candida antarctica* (Novozym 435®) em, exatamente, 5 mL de diversos solventes como segue e descritos na **Figura 1**: **(2i)** acetona + 20% (v/v) piridina; **(2j)** terc-butanol + 20% (v/v) piridina. A razão molar rutina/ácido succínico foi 1/12. Os meios reacionais foram agitados a 250 rpm, 72 horas a 60°C. Posteriormente, a enzima foi filtrada e o filtrado foi concentrado por destilação em baixa pressão.

Os substratos e a lipase imobilizada foram secas em sílica-gel num dessecador à pressão reduzida por 1 semana. As reações foram monitoradas pela análise por CCD (sílica gel 60F₂₅₄), usando como eluentes: acetato de etila/acetona/ácido acético/água (20:2:1:1, v/v/v/v). Sua separação foi feita, primeiramente, com papel cromatográfico preparativo (Whatman 3MM, 46 X 57 cm) com fase móvel da mistura de acetato de etila/acetona/ácido acético/água (20:2:1:1, v/v/v/v).

Este estudo colaborativo de síntese alternativa, utilizando uma enzima imobilizada, foi testado por ser uma reação regiosseletiva o que poderia ter facilitado a etapa de purificação do produto. Este estudo experimental foi realizado no Instituto de Química - Departamento de Química Fundamental (Prof. Dr. Leandro Helgueira de Andrade).

Figura 1. Síntese do succinato de rutina pela síntese química e enzimática

Legenda: Condições experimentais → Fórmulas estruturais do succinato de rutina (**2a**) sem uso do catalisador via síntese química; (**2b**), (**2c**), (**2g**) e (**2h**) via síntese enzimática regioseletiva. **R** = C(=O)CH₂CH₂COOH (anidrido succínico); **DMF**: N,N-dimetilformamida; **Novozyme[®] 435**: lipase imobilizada; **A**, **B**, **C**: indicação do anel flavonoide da rutina com atividade antioxidante; **RO** = acilação dos grupamentos glicosídeos da rutina. As setas em vermelho indicam as substituições realizadas.

4.2.3 Caracterização físico-química da rutina e do succinato de rutina

4.2.3.1 Coeficiente de partição octanol-água ($\log P$)

O valor de coeficiente de partição octanol-água ($\log P$) é um parâmetro físico-químico que avalia a solubilidade do succinato de rutina na fase aquosa e oleosa, relacionando os dados obtidos com as características físico-químicas das preparações cosméticas. Esta metodologia foi baseada em Rothwell *et al.* (2005), com modificações.

Para a realização do teste, exatamente 0,1 g de rutina e de succinato de rutina foram dissolvidas em exatamente 3 mL de 1-octanol, adicionando-se exatamente 3 mL de tampão fosfato pH 7,4 em tubos de ensaio (triplicata). As soluções foram agitadas por 30 minutos em agitador magnético e centrifugadas por 9 minutos a 1000 rpm. Após o procedimento, realizou-se a leitura de absorbância em espectrofotômetro UV-Visível, com cubeta de quartzo com 1 cm de caminho óptico, nos respectivos comprimentos de onda (λ) das fases aquosa (tampão fosfato pH 7,4; $\lambda = 352$ nm) e orgânica (1-octanol; $\lambda = 365$ nm), antes e depois do ensaio da agitação e centrifugação, usando-se como brancos de leitura a água destilada e o 1-octanol. O valor de $\log P$ foi calculado como indicado na **Equação 1**:

$$\log P = \frac{\log [\text{Arut ou Asucc rut em 1-octanol}]}{\log [\text{Arut ou Asucc rut em tampão fosfato pH 7,4}]}$$

Equação 1. Coeficiente de partição da rutina ou do succinato de rutina

Legenda:

Arut ou Asucc rut = Leitura de Absorbância da rutina ou Absorbância do succinato de rutina

$\log P$ = Valor do Coeficiente de Partição

4.2.3.2 Determinação da solubilidade

A solubilidade de uma substância é uma propriedade físico-química muito importante para auxiliar no desenvolvimento de formulações farmacêuticas e cosméticas, visando avaliar a uniformidade de incorporação de princípios ativos nas formulações, a segurança e a eficácia. A escolha dos solventes para o teste de solubilidade foi realizada com relação à ordem decrescente de polaridade e aos valores das constantes dielétricas, pois quanto maior este maior a capacidade do solvente em solvatar cargas opostas de dois compostos (BRUICE, 2004).

Para a realização do ensaio de solubilidade foram pesadas exatamente 10 mg de rutina e de succinato de rutina em balança analítica e transferiram-se para tubos de ensaio. Foram adicionados exatamente 1000,0 µL dos seguintes solventes: hexano, acetato de etila, N-N-dimetilformamida (DMF), piridina, clorofórmio, água, éter dietílico, álcool etílico absoluto, metanol, tolueno, glicerina, e acetonitrila para cada tubo de ensaio, utilizando micropipeta monocal canal fixo. Este método foi adaptado por PEDRIALI (2005).

4.2.4 Avaliação da segurança *in vitro*

Na segunda parte deste capítulo, após a síntese do derivado da rutina, foi necessária a realização de testes de segurança prévios visando sua incorporação segura em um produto de uso tópico (medicamento/cosmético) que será aplicado na pele humana. Buscou-se uma alternativa quanto a utilização de metodologia alternativa validada *in vitro* em relação às avaliações de toxicidade de cosméticos em animais. Conforme a legislação aprovada em 2003 no Parlamento da Europa, que aprovou a diminuição do uso de animais (redução da dor e estresse dos animais) em testes de eficácia de cosméticos e adaptação de testes *in vitro*, por exemplo em nosso caso, de avaliação da viabilidade celular de linhagens de fibroblastos humanos usando o ensaio de XTT (sodium 3'-[1-(phenylaminocarbonyl)- 3,4-tetrazolium]-bis (4-methoxy-6-nitro) benzene sulfonic acid hydrate) (EU Directive 2003/15/EC).

Esse ensaio é baseado na conversão do sal hidróxido de tetrazólio (XTT) para formazan laranja pela enzima succinato desidrogenase mitocondrial (atividade de cadeia respiratória celular em resposta ao contato direto com xenobióticos) nas células viáveis, conforme mostrado na **Figura 2** (MOSMANN, 1983; ROCHE APPLIED SCIENCE, 2005; SCHUCH, 2009).

Figura 2. Metabolização do XTT (sodium 3'-[1-(phenylaminocarbonyl)- 3,4-tetrazolium]-bis (4-methoxy-6-nitro) benzene sulfonic acid hydrate) para o sal solúvel de formazan pelas células viáveis (ROCHE APPLIED SCIENCE, 2005)

4.2.4.1 Descrição da metodologia: cultura celular

Para este ensaio de segurança foram adquiridas as células de fibroblastos humanos da linhagem MRC5 (selvagem para reparo de DNA) cultivadas, primeiramente, em garrafas de poliestireno com o seguinte meio de cultura Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM – *do inglês, Dulbecco Modified Eagle Medium*), suplementado com 10% de soro fetal bovino (FCS – *do inglês, Fetal Calf Serum*). Num segundo momento, estas células foram subcultivadas com lavagem de tampão fosfato salino (PBS – 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8 mM Na₂HPO₄; 1,5 mM KH₂PO₄; pH 7,6), seguida da adição de tripsina-EDTA pelo tempo necessário para que ocorresse a digestão da matriz proteica responsável pela aderência celular. A reação foi então bloqueada pela adição de meio de cultura (DMEM), quando então as células foram ressuspensas e passadas para novas garrafas de cultura (MOSMANN, 1983; ROCHE APPLIED SCIENCE, 2005; SCHUCH, 2009).

Para o início do ensaio foi necessário fazer a tripsinização (ressuspensão das células com tripsina-EDTA) e logo em seguida, adicionaram-se exatamente 2,0 mL de amostras de meio (aproximadamente 10⁴ células/mL) em placas de cultura celular *multiwell* com 6 poços (35 mm), com área de 9,6 cm² e incubá-las em estufa a 37°C em presença de 5% de CO₂.

Após 24 horas, o meio de cultura onde estavam as células (DMEM) foi substituído por um meio modificado (controle) ou adicionado com as amostras de rutina e de succinato de rutina (200,0 µL) nos valores de concentrações de 8,0; 6,0 e 4,0 mg/mL. Estas soluções de rutina e seu derivado foram preparadas e filtradas em filtro com membrana 0,22 µm (diâmetro

de 33 mm). Estes meios modificados presentes em placas de cultura celular *multiwell* com 6 poços foram incubados por 48 horas em estufa a 37°C, na presença de 5% de CO₂ (MOSMANN, 1983; ROCHE APPLIED SCIENCE, 2005; SCHUCH, 2009).

Passado este período, as placas foram preparadas para a avaliação da viabilidade celular pelo método de XTT. Por ser um teste colorimétrico, o XTT foi feito em meio sem *Phenol Red* para evitar que a cor do mesmo interferisse nos resultados. Foi utilizada a solução tampão fosfato salino (PBS) anteriormente descrito. Em um tubo separado, foi preparado o MIX XTT (50 de XTT *labeling reagent* : 1 de *Electron-coupling reagent*) (*Kit II Cell Proliferation XTT Roche*). Em seguida, a solução foi acrescentada na razão de 120 µL do MIX XTT para 1 mL de PBS, para depois ser colocada em contato com as células. No caso desta placa utilizada (6 poços com 35 mm cada e com área de 9,6 cm²) o volume medido da mistura de XTT foi de 758 µL.

Após aproximadamente 60 minutos de incubação, o meio (cor laranja) foi transferido para uma placa de Elisa (96 poços). As mudanças colorimétricas foram acompanhadas com a utilização de um espectrofotômetro *multiwell* – Leitor de Elisa (Glo-Max[®] Multi Detection System), a 490 e 750 nm. O tempo foi controlado de acordo com a coloração verificada nos pontos controle, sem deixar que a intensidade do laranja ficasse muito forte, pois nesse caso, as células teriam consumido todo o tetrazolium disponível, chegando ao platô da reação e impossibilitando a detecção de qualquer diferença entre os pontos experimentais.

A análise do resultado foi realizada subtraindo-se o valor obtido no comprimento de onda 490 nm e 750 nm, normalizado pelo branco e que foi feita, independentemente, para os dois comprimentos de onda (MOSMANN, 1983; ROCHE APPLIED SCIENCE, 2005; SCHUCH, 2009).

Este estudo colaborativo foi realizado no Instituto de Ciências Biomédicas - Departamento de Microbiologia (Prof. Dr. Carlos Frederico Martins Menck e Pós-Doutorando André Passaglia Schuch).

4.2.4.2 Análise estatística

Os dados obtidos no ensaio de segurança da rutina e do succinato da rutina foram analisados pela comparação estatística de média $\pm$ desvio padrão (DP). Inicialmente, utilizou-se a análise de variância (one-way ANOVA), seguido pelo teste de Teste de Fisher LSD ($p < 0,05$). Toda a análise estatística foi executada usando o programa Statistica 7.0 (StatSoft Inc. South America, Tulsa, OK, USA).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Elucidação estrutural e identificação dos compostos sintetizados

No presente trabalho, o intuito principal foi realizar a síntese do derivado hidrossolúvel da rutina (classe dos flavonoides) pela introdução de grupamentos carboxilatos às hidroxilas presentes nos glicosídeos da molécula de rutina, sem que ocorresse a substituição do anel flavonoide, processo que foi realizado por meio de uma modificação da técnica usada, anteriormente, pelo grupo de pesquisa francês, formado por Alluis, Pérol, El hajji e Dangles (2000). Estes pesquisadores realizaram esta síntese empregando algumas variações de condições, incluindo: (I) solvente (piridina e DMF), (II) temperatura (intervalo de 0 a 70°C), (III) catalisador (4-dimetilaminopiridina – DMAP), variações de anidrido succínico ou grupamento SO₃ e variações concentração de piridina (um excesso de 3 a 6 mol em relação à rutina).

Considerando os estudos realizados pelo grupo de pesquisa citado, a síntese do derivado da rutina foi planejada dentro das propostas sugeridas pelo processo da química verde, o qual envolveu a modificação da técnica usada, introduzindo grupos carboxilatos provenientes do excesso de 6 mol de anidrido succínico e utilizando como solvente o N,N-dimetilformamida (DMF) a 70°C, sem promover modificações significativas no núcleo flavonoide (PEDRIALI *et al.*, 2008). Este procedimento permitiu a reutilização do solvente a cada nova etapa de síntese, a não utilização de catalisadores caros no processo, o uso de vidrarias acessíveis e um gasto de energia mínimo, estando em consonância com a política do Laboratório de Cosmetologia da FCF/USP que objetiva resultados com menor agressão ao meio ambiente e maior acessibilidade em processos. Uma primeira identificação do produto de síntese formado foi realizada por meio da Cromatografia de Camada Delgada (CCD) em sílica gel 60F₂₅₄ usando como eluentes: acetato de etila/acetona/ácido acético/água (20:2:1:1, v/v/v/v) e obtêve-se os seguintes resultados: R_f da succinato de rutina foi de 0,5 e o da rutina foi de 0,4; nas mesmas condições de análise, indicando a formação de um outro produto diferente da rutina (ALLUIS *et al.*, 2000).

Ainda nesta primeira fase do trabalho, este composto hidrossolúvel foi separado e isolado, seguindo procedimentos com Cromatografia em Coluna (CC) de polivinilpolipirrolidona (PVPP), tendo como eluente metanol, método este adaptado de Salatino *et al.* (2007), ao contrário da Cromatografia de Sílica Gel C₁₈ implementado por

Alluis *et al.* 2000. O rendimento da reação foi de 85%, após a purificação em coluna de PVPP, sendo considerado adequado dentro da variação comparativa com os obtidos na literatura consultada (entre 50 e 90%) (ALLUIS *et al.*, 2000; BLATI *et al.*, 1998; PINTO *et al.*, 2008).

A elucidação da estrutura química do succinato de rutina (**Figura 1-2a**) e a confirmação da purificação da amostra foi realizada por meio da técnica de Ressonância Magnética Nuclear de Prótons (^1H -RMN), pela designação quantitativa de todos os sinais, após a sua purificação, como se segue:

^1H -NMR ((D₆)DMSO, 500 MHz): 12,69 (1s, OH-C(5)); 7,66 (m, 1H, H-C(2')); 7,51-7,57 (m, 1H, H-C(6')); 6,83 (d, J=8,0, 1H, H-C(5')); 6,41 (d, J=2,0, 1H, H-C(8)); 6,19 (d, J=2,5, 1H, H-C(6)); 5,50 (d, J=7,0, 1H, H-C(1')); 5,36 (t, J=7,5, 1H, H-C(3')); 5,29 (t, J=8,0, 1H, H-C(2')); 4,84 (t, J=9,75, 1H, H-C(4')); 4,63 (t, J=9,67, 1H, H-C(4')); 4,43 (s, 1H, H-C(1')); 3,7-3,5 (m, H-C(2''), H-C(3''); H-C(5'), 2H-C(6'), H-C(5'')); 2,40 (s, 24H, 6(CH₂CH₂COOH)); 0,97 (d, J=6,0, 3H, Me (6'')).

Além disso, por meio de uma leitura espectrofotométrica, foram obtidos os seguintes comprimentos de onda em água: 352 e 271 nm (característicos do anel flavonoide), sendo necessários para a confirmação da estrutura química do succinato de rutina (**Figura 1-2a**). Comparando estes dados com a rutina nas mesmas condições (361 nm – anel flavonoide), foi verificado que ocorreu um deslocamento para menor comprimento de onda (-9 nm), possivelmente, devido às substituições ocorridas. Este efeito é conhecido como deslocamento *hipsocrômico* que exigirá maior energia para produzir a ressonância. Esta interação entre a água e o succinato de rutina pode impedir o deslocamento de elétrons e, conseqüentemente, a produção de um estado mais excitado (BRUICE, 2004; PEDRIALI *et al.*, 2008).

A técnica do RMN (espectro de ^{13}C -RMN e ^1H -RMN) foi usada para identificar a estrutura de succinato de rutina e confirmar a eficácia da separação em coluna de PVPP. A atribuição quantitativa indicada anteriormente de todos os sinais confirmou a pureza da amostra. A integração das atribuições dos picos no espectro de ^1H -RMN confirmou e correlacionou o rendimento quantitativo das substituições ocorridas nos hidrogênios das hidroxilas pelos grupamentos succinil nas posições C-2'', C-3'', C-4'', C-2''', C-3''' e C-4'''. Indicou, também, que não houve nenhuma modificação nas hidroxilas do núcleo flavonoide, o qual não seria interessante devido à sua possível perda de atividade antirradicalar. Este processo foi realizado usando o programa MestreNova, versão 5.0.1-1979, 2007 do Laboratório Mestre Lab Research S.L.

Ainda em relação a uma proposta dentro da *química verde* foram realizadas novas rotas sintéticas, como a biocatálise. Este processo considerado de alta especificidade e seletividade, tem sido reconhecido como uma alternativa favorável para catalisar a acilação dos açúcares dos flavonoides com ácidos graxos de tamanhos de cadeia variados e ácidos dicarboxílicos. A acilação regiosseletiva destes compostos pode utilizar lipases e proteases alcalinas imobilizadas (*Candida antarctica* e *Bacillus subtilis*, respectivamente) em solventes orgânicos anidros como terc-butanol, mistura de acetona e piridina; dimetilsulfóxido e acetonitrila (ARDHAOUI *et al.*, 2004(a); ARDHAOUI *et al.*, 2004(b); DANIELI *et al.*, 1997; GAO *et al.*, 2001; NAKAJIMA *et al.*, 1999; RIVA, 2002). Os açúcares presentes em várias substâncias vegetais são, frequentemente, distribuídos na natureza e classificados como glicosídeos. A acilação desses açúcares acontece com grupamentos alifáticos e ácidos aromáticos (principalmente o acético, malônico e ferúlico), especificamente nas hidroxilas presentes. Esta reação regiosseletiva poderia facilitar a etapa de purificação do produto final (ARDHAOUI *et al.*, 2004(a); ARDHAOUI *et al.*, 2004(b); GAO *et al.*, 2001; RIVA, 2002).

Neste trabalho, em paralelo com a síntese química, foi realizado um estudo preliminar de síntese regiosseletiva catalisada pela lipase da *Candida antarctica*, uma enzima imobilizada, em condições experimentais diversas na tentativa de substituição da síntese química não regiosseletiva. Esta síntese alternativa foi baseada nos trabalhos de Xiao e colaboradores (2005), Kontogianni e colaboradores (2003), Ardhaoui e colaboradores (2004a e 2004b), Passicos e colaboradores (2004) e Danieli e colaboradores (1997). Nestes estudos eram utilizados reagentes junto com a rutina ou quercetina com cadeia carbônica maior, entre eles, o adipato de divinila, o ácido láurico, o ácido mirístico e o ácido hexadecandioico, porém foram realizadas tentativas de reação do anidrido succínico e rutina em condições similares com a dos trabalhos de pesquisa citados.

Primeiramente, foi realizada a síntese à temperatura de 25°C em 48 horas, variando cinco solventes diferentes isolados ou associados, num excesso molar de reagentes de 1/12 (rutina/anidrido succínico). Como açúcares e seus glicosídeos são usualmente compostos polares (presentes na rutina), foi investigada, inicialmente, a ação catalisadora da enzima lipase B em diferentes solventes orgânicos adequados também para a solubilização da rutina. Em testes preliminares foi verificado que os solventes DMF e piridina puros, rapidamente, inativaram a enzima, porém eram os solventes utilizados na síntese proposta por Pedriali (2005). A associação da acetona com o DMF na proporção de 3:1 (**Figura 1-2d**), também, causou a inativação da enzima e a adição dos solventes como a acetona (**Figura 1-2e**) e o terc-butanol (**Figura 1-2f**) isolados, não houve a solubilização da rutina no meio reacional.

Por um outro lado, foram utilizados outros solventes associados como descritos: **Figura 1-2b** - acetona + 20% (v/v) da piridina; **Figura 1-2c** - terc-butanol + 20% (v/v) piridina, sendo obtido rendimento de 10% em cada processo. As observações do uso eficiente dos solventes orgânicos tanto com a enzima lipase B quanto com a rutina foram relatadas por Danieli *et al.* (1997) e foram estudadas e modificadas dentro do desenvolvimento deste trabalho.

Num segundo momento, houve a tentativa de aumento de temperatura para 60°C por 72 horas, variando apenas dois solventes: acetona + 20% (v/v) piridina (**Figura 1-2g**) e terc-butanol + 20% (v/v) piridina (**Figura 1-2h**), numa proporção molar menor que a anterior de 1/6 (rutina/anidrido succínico). Os rendimentos obtidos foram: 14% e 12% (**Figura 1-2g** e **2h**, respectivamente). Numa terceira tentativa, foi usado o ácido succínico em vez do anidrido succínico nas mesmas condições descritas acima, porém numa proporção molar de reagentes de 1/12 (rutina/anidrido succínico) e não houve formação de produtos em nenhum dos solventes testados: acetona + 20% (v/v) piridina (**Figura 1-2i**) e butanol + 20% (v/v) piridina (**Figura 1-2j**).

Após a realização da purificação dos produtos formados da esterificação da rutina com o anidrido succínico na presença da enzima imobilizada (da *Candida antarctica*), estes foram analisados quanto às posições das substituições ocorridas na molécula da rutina. A integração das atribuições dos picos no espectro de ^{13}C -RMN, conforme apresentado na **Tabela 1**, correlacionou o rendimento quantitativo das substituições ocorridas nas hidroxilas secundárias pelos grupamentos succinil nas posições C-3'' e C-4''' (**Figura 1-2g** e **2h**) e posição C-4''' (**Figura 1-2b** e **2c**). Demonstrou-se, também, que não houve nenhuma modificação nas hidroxilas do núcleo flavonoide.

De acordo com a estratégia descrita por Xiao, Wu, Zhang e Lin (2005), a observação da substituição de esterificação ocorrida no grupamento da hidroxila pode causar um deslocamento do carbono esterificado para a região de baixo campo magnético (*deshielded*), enquanto o deslocamento químico do carbono adjacente se desloca para a região de alto campo magnético (*shielded*) no espectro de ^{13}C -RMN. Na análise do espectro de ^{13}C -RMN dos compostos **Tabela 1-2b** e **2c**, foram observados os deslocamentos químicos da posição do C-4''' para a região de baixo campo magnético de 71,7 para 72,7 ppm para ambos, enquanto que da posição dos carbonos adjacentes para a região de alto campo magnético: C-3''' (70,9 para 70,7 ppm) e C-5''' (68,4 para 67,4 ppm). No entanto, para os compostos **Tabela 1-2g** e **2h**, além da observação anterior na substituição do C-4''' para a região de baixo campo magnético de 71,7 para 72,7 ppm, sugere-se também a substituição ocorrida na posição do C-

3'' de 73,3 para 78,6 ppm e carbonos adjacentes: C-2'' (74,2 para 72,7 ppm) e C-4'' (69,8 para 69,2 ppm).

Estes experimentos regioseletivos indicaram que as substituições da esterificação podem ser efetivamente controladas por ajustes em concentrações de reagentes e enzima, escolha de solventes, ajustes de temperatura e número de dias de reação. Porém, para o desenvolvimento deste trabalho e possível utilização do succinato de rutina em formulações fotoprotetoras, o rendimento das reações se apresentou baixo, além de um número de uma ou duas posições substituídas na molécula da rutina também ser pouco para que sua solubilidade fosse adequada em água como ocorreu na reação do composto **Tabela 1-2a** (seis posições substituídas). Então neste caso, foi escolhida a primeira síntese realizada e modificada por Pedriali (2005) por via química sem a adição de catalisadores.

A elucidação da estrutura química dos compostos **2b**, **2c**, **2g** e **2h** foi realizada por meio da técnica de Ressonância Magnética Nuclear de Prótons (¹H-RMN) pela designação quantitativa de todos os sinais, após a sua purificação, como descrito a seguir:

(2b) e **(2c)** → ¹H-NMR ((D₆)DMSO, 500 MHz): 12,69 (1s, OH-C(5)); 7,55 (m, 1H, H-C(2')); 7,46 (m, 1H, H-C(6')); 6,84 (d, J=8,0, 1H, H-C(5')); 6,37 (d, J=2,0, 1H, H-C(8)); 6,17 (d, J=2,5, 1H, H-C(6)); 5,42 (d, J=7,0, 1H, H-C(1')); 4,39 (s, 1H, H-C(1'')); **4,81** (d, J=8,8, H-C(4'')); 3,72-3,05 (m, H-C(2'), H-C(3'); H-C(4'); H-C(5'), 2H-C(6'), H-C(2'')); H-C(3'')); H-C(5'')); 2,41 (s, CH₂CH₂COOH); 1,00 (d, J=6,0, Me (6'')).

(2g) / **(2h)** → ¹H-NMR ((D₆)DMSO, 500 MHz): 12,69 (1s, OH-C(5)); 7,55 (m, 1H, H-C(2')); 7,46 (m, 1H, H-C(6')); 6,84 (d, J=8,0, 1H, H-C(5')); 6,37 (d, J=2,0, 1H, H-C(8)); 6,17 (d, J=2,5, 1H, H-C(6)); 5,42 (d, J=7,0, 1H, H-C(1')); **4,80** (d, J=8,5, 1H, H-C(3')); 4,39 (s, 1H, H-C(1'')); **4,82** (d, J=8,8, H-C(4'')); 3,72-3,05 (m, H-C(2'), H-C(4'); H-C(5'), 2H-C(6'), H-C(2'')); H-C(3'')); H-C(5'')); 2,41 (s, CH₂CH₂COOH); 1,00 (d, J=6,0, Me (6'')).

Tabela 1 – Designação quantitativa do espectro de ^{13}C -RMN da rutina e dos seus derivados (D_6 – DMSO) em ppm

Número dos Carbonos	Rutina	2a	2b	2c	2g	2h
C(4)	177,5	177,7	178,0	178,1	178,0	178,1
C(7)	164,2	164,8	165,9	165,8	165,9	165,7
C(5)	161,1	161,6	162,7	162,7	162,7	161,7
C(8a)	156,7	157,0	157,3	157,2	157,3	157,2
C(2)	156,3	156,9	157,9	157,9	157,9	156,9
C(4')	148,6	149,0	149,0	149,0	149,0	149,0
C(3')	144,9	145,4	145,3	145,3	145,3	145,3
C(3)	133,2	133,7	133,7	133,7	133,6	133,6
C(6')	121,7	121,9	122,0	122,0	122,0	122,0
C(1')	121,4	121,5	121,6	121,5	121,6	121,5
C(2')	115,3	116,7	116,4	116,4	116,4	116,4
C(5')	116,4	115,7	116,2	116,2	116,2	116,2
C(4a)	104,2	104,3	104,4	104,2	104,4	104,2
C(1'')	101,3	101,6	101,6	101,6	101,6	101,6
C(1''')	100,9	101,2	101,6	101,6	101,6	101,6
C(6)	98,8	99,2	99,8	99,7	99,8	99,8
C(8)	93,7	94,1	94,6	94,6	94,6	94,6
C(3'')	73,3	74,5	78,7	78,6	78,6	78,6
C(5'')	76,1	72,3	76,3	76,3	75,8	75,8
C(2'')	74,2	72,2	72,7	72,7	72,7	72,7
C(4''')	71,7	72,1	72,7	72,7	72,7	72,7
C(3''')	70,9	70,8	70,7	70,7	70,7	70,7
C(2''')	70,5	70,1	70,1	70,1	70,2	70,2
C(4'')	69,8	69,2	69,8	69,8	69,2	69,2
C(6'')	67,2	68,5	68,5	68,5	68,5	68,4
C(5''')	68,4	67,4	67,4	67,4	67,4	67,4
Me (6''')	17,8	18,1	18,6	18,6	18,5	18,6
COCH ₂ CH ₂ COOH	-----	172,5 – 172,2	172,9	172,8	172,8	172,9
CH ₂ CH ₂ COOH	-----	29,4 – 29,1	-----	-----	-----	-----
CH ₂ (Suc)	-----	-----	31,3	31,2	31,3	31,2
CH ₂ (Suc)	-----	-----	30,6	30,5	30,5	30,5
CO ₂ H	----	174,7 -174,0	175,3	175,4	174,4	175,3
COCH ₂ CH ₂ COOH	-----	172,5 -172,2	172,9	172,9	172,8	172,8

Legenda: (2a): substituído nas posições → 2'',3'',4'',2''',3''',4'''

(2b) e (2c): substituído na posição → 4'''

(2g) e (2h): substituído nas posições → 3'' e 4'''

5.2 Caracterização físico-química da rutina e do succinato de rutina

Um dos métodos usados para determinar a solubilidade de um composto envolve o coeficiente de partição octanol-água ($\log P$). Este valor é um parâmetro que reflete a afinidade individual do composto por solventes polares (água) e não-polares (octanol), relatado como partição que determina a solubilidade *in vitro* apropriada nas preparações cosméticas e farmacêuticas.

A **Tabela 2** evidencia a solubilidade da rutina e do succinato de rutina em diversos solventes apróticos e próticos que apresentam constantes dielétricas variadas. Estes solventes fazem parte de um teste padrão de solubilidade não sendo adicionados necessariamente nas formulações cosméticas, exceto a glicerina e principalmente a água (foco deste estudo). Diante de uma análise qualitativa, verificou-se que o derivado da rutina tornou-se insolúvel em solventes apolares, os quais possuem baixa constante dielétrica. Quanto mais baixo for este valor, menor a interação destes com compostos iônicos, conforme observado com o succinato de rutina. Em contrapartida a rutina apresentou-se parcialmente solúvel nos solventes apróticos ou apolares, portanto mostrando-se mais lipossolúvel que o seu derivado sintetizado.

Num segundo momento, foi feita uma análise quantitativa da solubilidade em água da rutina comparando-se com o succinato de rutina. Observou-se que a solubilidade da rutina em água teve um aumento em torno de 80 vezes, indo de 0,125 g/L (rutina) para 10 g/L (succinato de rutina). Isto ocorreu como resultado da mistura de quantidades variáveis de anidridos succínicos introduzidos nos açúcares presentes na estrutura da rutina, que apresentaram tamanhos de cadeias alquílicas curtas e forte interação dos grupamentos carboxilatos com a água. Portanto, o método usado e adaptado da modificação química da rutina comprovou-se ser satisfatoriamente eficiente e prático. Isto foi importante para a molécula da rutina, pois aumentou as possibilidades de sua utilização em formulações com grande quantidade de água do tipo emulsão O/A e geis hidrófilos já que antes o seu uso era limitado devido à sua baixa solubilidade em água (0,125 g/L).

Este resultado quantitativo de solubilidade foi, também, confirmado pelo dado de coeficiente de partição octanol-água (**Tabela 2**), porque o succinato de rutina apresentou um valor de $\log P$ ($-1,13 \pm 0,02$), considerado elevado em relação ao $\log P$ da rutina ($0,85 \pm 0,05$). Estes resultados indicaram que quanto menor o valor em relação a zero mais o composto terá afinidade com solventes iônicos (constante dielétrica alta), e em caso contrário, quanto maior o valor em relação a zero mais o composto terá afinidade com solventes

apolares (constante dielétrica baixa). Estes resultados quantitativos propiciaram a análise do aumento da hidrossolubilidade da rutina modificada. Em outra parte deste trabalho foi testada a sua estabilidade, quando incorporada em formulações cosméticas como uma emulsão fotoprotetora e confirmando a manutenção de suas propriedades originais da rutina de origem.

Tabela 2 – Solubilidade da rutina e do succinato de rutina em solventes apróticos e próticos. Determinação experimental dos valores de $\log P$ no sistema octanol/água

Solventes	Fórmula estrutural	Constante Dielétrica (ε, a 25 °C)*	Solubilidade dos compostos	
			Rutina	Succinato de Rutina
<i>Solventes próticos</i>				
Água	H ₂ O	79,0	±	+
Metanol	CH ₃ OH	32,6	+	±
Álcool Etilico Absoluto (99,9%)	CH ₃ CH ₂ OH	25,0	±	±
<i>Solventes apróticos</i>				
Glicerina	HOCH ₂ CH(OH)CH ₂ OH	47,2	+	–
Acetonitrila	CH ₃ CN	38,0	–	±
N,N-Dimetilformamida	(CH ₃) ₂ NCHO	37,0	+	+
Piridina	C ₅ H ₅ N	12,5	+	+
Acetato de etila	CH ₃ COOCH ₂ CH ₃	6,0	+	±
Clorofórmio	CHCl ₃	4,8	±	–
Éter dietílico	CH ₃ CH ₂ OCH ₂ CH ₃	4,3	±	–
Tolueno	C ₆ H ₅ CH ₃	2,4	±	–
Hexano	CH ₃ (CH ₂) ₄ CH ₃	1,9	±	–
<u>Coefficiente de partição (Dado quantitativo de solubilidade)</u>				
<i>log P ± DP (n = 3)</i>			0,85 ± 0,07	- 1,13 ± 0,03
			Mais apolar	Mais polar

* De acordo com Bruice (2004)

(+) solúvel, (±) parcialmente solúvel apresentando turbidez, (–) insolúvel

DP – Desvio Padrão

5.3 Avaliação da segurança *in vitro* da rutina e do succinato de rutina

Uma das preocupações que ocorreu neste trabalho foi com a avaliação da segurança do succinato de rutina e sua comparação com a rutina, utilizando a alternativa de ensaio de toxicidade *in vitro*. Conforme a legislação divulgada em 2003 no Parlamento da Europa que aprovou a diminuição do uso de animais (redução da dor e estresse dos animais) em testes de eficácia de cosméticos e adaptação de testes *in vitro*, em nosso caso, o ensaio de viabilidade celular foi feito em fibroblastos humanos pelo método do XTT. Primeiramente, foi realizado um *screening* de concentrações, tanto da rutina quanto do succinato de rutina, que variaram de 250 a 0,0625 mg/mL com a finalidade de uma pré-seleção de caráter preliminar dos melhores resultados de viabilidade celular (menor % de morte celular) conforme mostrado na **Figura 3A** (rutina) e **Figura 3B** (succinato de rutina).

Os resultados obtidos com o ensaio de viabilidade celular pelo método de XTT foram analisados estatisticamente por meio do software Statistica[®] 7.0 (Stat SoftTM, Tulsa, Okla., USA). Esta análise foi realizada com as médias ($n = 3$) dos parâmetros: de porcentagem de viabilidade celular e *screening* de concentração da rutina e do succinato de rutina. Analisaram-se as variâncias dos tratamentos quanto à sua homogeneidade pelo teste de Hartley ($\alpha = 0,05$). Para os tratamentos paramétricos, as médias foram testadas por meio da análise de variância univariada e comparadas pelo teste de Tukey HSD a 5% de probabilidade.

Referente aos dados de porcentagem de viabilidade celular da rutina (**Figura 3A**) observou-se que o intervalo de concentrações de 2 a 250 mg/mL houve redução de até 67% no número de células viáveis. No entanto, para o succinato de rutina (**Figura 3B**), observou-se que o intervalo de concentração responsável pela redução do número de células viáveis (até 73,4%) foi menor, de 8 a 250 mg/mL.

Entretanto, para o intervalo de concentração entre 1 e 0,0625 mg/mL (rutina); e 4 e 0,0625 mg/mL (succinato de rutina), os resultados apresentaram-se estatisticamente iguais entre si; e entre o controle (meio de cultura) e o branco (água destilada), tendo uma variação de $p > 0,96-0,99$ e $p > 0,23-0,89$, respectivamente, com uma redução de até 3,8 e 16,9%, respectivamente, no número de células viáveis.

Apesar das concentrações de 1 mg/mL (rutina) e 4 mg/mL (succinato de rutina) serem estatisticamente iguais ao controle, no segundo caso houve a morte celular de 16,9% (valor significativo). Então, foi realizada uma nova purificação da molécula e o ensaio da segurança

foi repetido nos valores 6, 5 e 4 mg/mL para o succinato de rutina, tendo como padrão a amostra da rutina nas mesmas concentrações. No refinamento da análise (**Figura 4**), após a purificação do succinato de rutina houve a confirmação de sua concentração de 4 mg/mL ser estatisticamente igual ao controle, com -12,8% de morte celular, o que representou aumento da proliferação celular, podendo ser atribuído à capacidade nestas condições de estimular a multiplicação de células.

Figura 3. Efeitos da rutina (**A**) e do succinato de rutina (**B**) sobre a viabilidade celular de fibroblastos humanos pelo método de XTT

Letras diferentes = indicam diferenças estatisticamente significativas (n=3)

Figura 4. Efeitos da rutina e do succinato de rutina sobre a viabilidade celular de fibroblastos humanos da linhagem MRC5 (selvagem para reparo de DNA) pelo método de XTT

Letras diferentes = indicam diferenças estatisticamente significativas (n=3)

Portanto, segundo a metodologia empregada, as concentrações de 0,4% (4 mg/mL ou 3,30 mmol) para o succinato de rutina e 0,1% (1 mg/mL ou 1,63 mmol) para a rutina foram os valores que ocasionaram menor morte celular (– 12,8 e 3,8%, respectivamente) e, portanto, estas moléculas podem ser incorporadas em formulações cosméticas nestas concentrações, propiciando a elaboração de produtos seguros. Testes adicionais de segurança deverão ser conduzidos no produto final, considerando os diversos aspectos de aplicação deste.

Comparando estes dados de concentração em molaridade, verificou-se que o grau de segurança do derivado hidrossolúvel (equivalente de rutina) duplicou em massa molar em relação à molécula de rutina, que em relação a concentração em porcentagem quadruplicou, mas deve-se considerar a diferença de massa molar.

6 CONCLUSÕES

✓ A realização de um estudo de síntese regiosseletiva catalisada pela lipase imobilizada da *Candida antarctica* em condições experimentais diversas como opção à síntese química não regiosseletiva, resultou rendimento do produto formado nas reações entre 10-14%, além de apresentar o número baixo de substituições nas hidroxilas dos açúcares da rutina como o produto **2b**; **2c** (posição C-4'') e **2g** e **2h** (posições C-3'' e C-4'').

✓ Foi escolhida a síntese química modificada do succinato de rutina (**2a**) pela introdução de grupos carboxilatos às hidroxilas dos grupamentos glicosídeos da molécula de rutina, utilizando o desenvolvimento de uma tecnologia da *química verde* seguida pela purificação com Cromatografia em Coluna de Polivinilpolipirrolidona (PVPP) e pela elucidação estrutural por ^1H -RMN e ^{13}C -RMN, obtendo-se um rendimento de 85%, considerado alto e compatível com o custo do processo.

✓ A solubilidade em água do succinato de rutina (10g/L) foi em torno de 80 vezes maior que da rutina (0,125g/L), o que a torna insolúvel em solventes apolares quando comparada com a rutina. Este resultado de solubilidade foi, também, confirmado pelo coeficiente de partição octanol-água, pois o succinato de rutina apresentou um valor de $\log P$ ($-1,13 \pm 0,02$) mais baixo em relação ao valor de $\log P$ da rutina ($0,85 \pm 0,05$), representando maior polaridade do succinato de rutina.

✓ A realização do ensaio de viabilidade celular com fibroblastos humanos (MRC5), indicou, após um *screening* dos valores de concentrações da rutina e do succinato de rutina (250 a 0,0625 mg/mL), que as concentrações de 0,1% (1 mg/mL ou 1,63 mmol) e 0,4% (4 mg/mL ou 3,30 mmol), respectivamente, apresentaram os menores valores (3,8% e - 12,8%) de morte celular e assim, ambas moléculas são indicadas para ser incorporadas em formulações cosméticas de uma forma que promova segurança ao usuário, sem o risco de reações tóxicas.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ABIHPEC - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE HIGIENE PESSOAL, PERFUMARIA E COSMÉTICOS. **Panorama do Setor Cosmético**. Disponível em: http://www.abihpec.org.br/conteudo/panorama_do_setor_2010-2011-14042011.pdf. Acesso em: 8 mai. 2011.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos**. Brasília: ANVISA, 2003. 43p.

ALLEGRETTI, M.H. Extractive reserves: an alternative for reconciling development and environmental conservation in Amazonia. In: ANDERSON, A.B., ed. **Alternatives to deforestation: steps toward sustainable use of the Amazon rain forest**. New York: Columbia University Press, 1990. p.252-264.

ALLUIS, B.; PÉROL, N.; EL HAJJÍ, H.; DANGLES, O. Water-soluble flavonol (=3-hydroxy-2-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one) derivatives: chemical synthesis, colouring and antioxidant properties. **Helvetica Chimica Acta**, v.83, n.2, p.428-443, 2000.

ARDHAOU, M.; FALCIMAIGNE, A.; ENGASSER, J.M.; MOUSSOU, P.; PAULY, G.; GHOU, M. Acylation of natural flavonoids using lipase of *Candida Antarctica* as biocatalyst. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.29, n.1-6, p.63-67, 2004a.

ARDHAOU, M.; FALCIMAIGNE, A.; OGNIER, S.; ENGASSER, J.M.; MOUSSOU, P.; PAULY, G.; GHOU, M. Effect of acyl donor chain length and substitutions pattern on the enzymatic acylation of flavonoids. **Journal of Biotechnology**, v.110, n.3, p.265-271, 2004b.

BLATI, C.T.T.; SANTOS, M.D.; SALATINO, A. Flavonoids of *Bignoniaceae* from the “cerrado” and their possible taxonomic significance. **Plant Systematics and Evolution**, v.210, n.3-4, p.289-292, 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. Resolução n.196, de 10 de outubro de 1996. Aprova as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos. **Diário Oficial da União**, Brasília, n.201, 16 out. 1996. Seção 1, p.21082.

BRUCE, P.Y. Substitution reactions of alkyl halides. In: _____. **Organic chemistry**. 4.ed. Upper Saddle River: Prentice Hall, 2004. p.390-393.

CASTRO, H.F.; ANDERSON, W.A. Fine chemicals by biotransformation using lipases. **Química Nova**, v.18, n.5, p.544-554, 1995.

CASTRO, H.F.; OLIVEIRA, P.C.; SOARES, C.M.F. Síntese de ésteres terpenóides por via enzimática: influência do tamanho da cadeia alifática do ácido graxo e da estrutura do álcool de terpeno. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.17, n.3, p.224-228, 1997.

CORREIA, C.R.D.; COSTA, P.R.R.; FERREIRA, V.F. Vinte e cinco anos de reações, estratégias e metodologias em química orgânica. **Química Nova**, v.25, supl.1, p.82-89, 2002.

* As referências bibliográficas estão de acordo com a norma NBR6023/2002 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

DANIELI, B.; LUISETTI, M.; SAMPOGNARO, G.; CARREA, G.; RIVA, S. Regioselective acylation of polyhydroxylated natural compounds catalyzed by *Candida Antarctica* lipase B (Novozym 435) in organic solvents. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.3, n. 1-4, p.193-201, 1997.

DIRECTIVE 67/548/EEC. Council Directive on the approximation of laws, regulations and administrative provisions relating to the classification, packaging and labelling of dangerous substances. **Official Journal**, 196, p. 1-98, Aug. 1967.

DIRECTIVE 76/768/EEC. Council Directive on the approximation of the laws of the Members States relating to cosmetics products. **Official Journal**, L262, p. 169-200, 27 Sept. 1976.

DIRECTIVE 93/35/EEC. Amending for the sixth time Directive 76/768/EEC on the approximation of the laws of the Member States relating to cosmetic products. **Official Journal**, L151, p. 32-37, 23 Jun. 1993.

DIRECTIVE 2000/33/EU for the 21st Amendment of Annex V of the EU Directive 86/906/EEC for classification and labeling of hazardous chemicals: Test Guideline B.41 'phototoxicity *in vitro* 3T3 NRU phototoxicity test'. **Official Journal of the European Communities**, L136, p.98-107, 8 Jun. 2000.

DIRECTIVE 2003/15/EC of the European Parliament and the Council of 27 February 2003 amending Council Directive 76/768/EEC on the approximation of the law of the Member States relating to cosmetic products. **Official Journal of the European Union**, L66, p.26-35, Mar. 2003.

FRESHNEY, R.I. **Culture of animal cells**: a manual of basic technique. 5.ed. Hoboken: Wiley-Liss, 2005. p.3-21.

GAO, C.I.; MAYON, P.; MACMANUS, D.A.; VULFSON, E.N. Novel enzymatic approach to the synthesis of flavonoid glycosides and their esters. **Biotechnology and Bioengineering**, v.71, n.3, p.235-243, 2001.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, v.27, n.1, p.1-93, 2006.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística 2010. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/geociencias/recursosnaturais/ids/ids2010.pdf>. Acesso em: 12 fev. 2011.

International IUPAC Conference on Green Chemistry, 3., 2010, Ottawa. **Benign Synthesis (catalysis, solvents, reagents)**. Ottawa: IUPAC, 2010. Disponível em: http://www.icgc2010.ca/about/conference_topics.html. Acesso em: 25 mar. 2011.

KNOX, P.; UPHIL, P.F.; FRY, J.R.; BENFORD, J.; BALLS, M. The FRAME multicentre on *in vitro* cytotoxicology. **Food and Chemical Toxicology**, v.24, n.6-7, p.457-463, 1986.

KONTOGIANNI, A.; SKOURIDOU, V.; SERETI, V.; STAMATIS, H.; KOLISIS, F.N. Lipase-catalyzed esterification of rutin and narigin with fatty acids of medium carbon chain. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.21, n. 1-2, p.59-62, 2003.

LENARDÃO, E.J.; FREITAG, R.A.; DABDOUB, M.J.; BATISTA, A.C.F.; SILVEIRA, C.C. "Green Chemistry": os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa. **Química Nova**, v.26, n.1, p.123-129, 2003.

LIEBSCH, M.; SPIELMANN, H. Currently available *in vitro* methods used in the regulatory toxicology. **Toxicology Letters**, v.127, n.1-3, p.127-134, 2002.

MENDELSON, R.; BALICK, M.J. Valuing undiscovered pharmaceutical in tropical forests. **Economic Botany**, v.51, n.3, p.328, 1997.

MOREIRA, A.C.; MÜLLER, A.C.A.; PEREIRA Jr., N.; ANTUNES, A.M.S. Pharmaceutical patents on plant derived materials in Brazil: policy, law and statistics. **World Patent Information**, v.28, n.1, p.34-42, 2006.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v.65, n. 1-2, p.55-63, 1983.

NAKAJIMA, N.; ISHIHARA, K.; ITOH, T.; PURUYA, T.; HAMADA, H. Lipase-catalyzed direct and regioselective acylation of flavonoid glucoside for mechanistic investigation of stable plant pigments. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.87, n.1, p.105-107, 1999.

PASSICOS, E.; SANTARELLI, X.; COULON, D. Regioselective acylation of flavonoids catalyzed by immobilized *Candida Antarctica* lipase under reduced pressure. **Biotechnology Letters**, v.26, n. 13, p.1073-1076, 2004.

PEDRIALI, C.A. **Síntese química de derivados hidrossolúveis da rutina**: determinação de suas propriedades físico-químicas e avaliação de suas atividades antioxidantes. São Paulo, 2005. 124p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

PEDRIALI, C.A.; UCHOA, A.F.; BERNUSO, L.C.; POLAKIEWICZ, B. The synthesis of a water-soluble derivative of rutin as an antiradical agent. **Química Nova**, v.31, n.8, p.2147-2151, 2008.

PINTO, A.C.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S; LOPES, N.P.; EPIFANIO, R.A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v.25, supl.1, p.45-61, 2002.

PINTO, M.S. **Compostos bioativos de cultivares brasileiros de morango (*Fragaria ananassa* Duch.)**: caracterização e estudo de biodisponibilidade dos derivados de ácido elágico. São Paulo, 2008. 138p. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

PRESGRAVE, O.A. Alternativas para animais de laboratório: do animal ao computador. In: ANDRADE, A.; PINTO, S.C.; DE OLIVEIRA, R.S., orgs. **Animais de laboratório**: Criação e Experimentação. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2002. 387p.

RAIMUNDO, M.M.; GOLDIM, J.R. Ética da pesquisa em modelos animais. **Bioética**, v.10, n.1, p.31-44, 2002.

REGULAMENTO (CE) n.º 440/2008 da Comissão, de 30 de Maio de 2008, que estabelece métodos de ensaio nos termos do Regulamento (CE) n.º 1907/2006 do Parlamento Europeu e do Conselho relativo ao registo, avaliação, autorização e restrição de substâncias químicas (REACH), **Official Journal**, L 142, p. 1, 31 May 2008.

REGULAMENTO (CE) n.º 1223/2009 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 30 de Novembro de 2009, relativo aos produtos cosméticos; **Official Journal**, L 342, p. 59, 22 Dec.2009.

REGULAMENTO (CE) n.º 761/2009 da Comissão, de 23 de Julho de 2009, que altera, tendo em vista a adaptação ao progresso técnico, o Regulamento (CE) n.º 440/2008 que estabelece métodos de ensaio nos termos do Regulamento (CE) n.º 1907/2006 do Parlamento Europeu e do Conselho relativo ao registo, avaliação, autorização e restrição de substâncias químicas (REACH).

RIVA, S. Enzymatic modification of the sugar moieties of natural glycosides. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.19-20, p.43-54, 2002.

ROCHE APPLIED SCIENCE. **Cell Proliferation Kit II (XTT) Version 2005**. Colorimetric assay (XTT based) for the non-radioactive quantification of cell proliferation and viability. Disponível em: [http://www.roche-applied-science.com/pack-insert/1465015a .pdf](http://www.roche-applied-science.com/pack-insert/1465015a.pdf). Acesso em: 05 fev. 2011.

ROTHWELL, J.A.; DAY, A.J.; MORGAN, M.R.A. Experimental determination of octanol-water partition coefficients of quercetin and related flavonoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, n.11, p.4355-4360, 2005.

RSC Publishing. Royal Society of Chemistry. **Green Chemistry**. Disponível em: <http://rsc.org/Publishing/Journals/gc/Greenchemistrynewsarchive.asp>. Acesso em: 23 fev. 2011.

SALATINO, A.; SALATINO, M.L.F.; NEGRI, G. Traditional uses, chemistry and pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.18, n.1, p.11-33, 2007.

SCHUCH, A.P. **Avaliação da ação genotóxica induzida pela radiação ultravioleta solar na molécula de DNA**. São Paulo, 2009. 150p. Tese de Doutorado – Instituto de Ciências Biomédicas – Universidade de São Paulo.

STEPHENS, M.L.; GOLDBERG, A.M.; ROWAN, A.N. The first forty years of the alternatives approach: refining, reducing and replacing the use of laboratory animals. In: SALEM, D.J.; ROWAN, A.N., eds. **The state of the animals 2001**. Washington: Humane Society Press, 2001. p.121–135. (Public policy series).

TUNDO, P.; ANASTAS, P.; BLACK, D.S.; BREEN, J.; COLLINS, T.; MEMOLI, S.; MIYAMOTO, J.; POLYAKOFF, M.; TUMAS, W. Synthetic pathways and processes in green chemistry: introductory overview. **Pure and Applied Chemistry**, v.72, n.7, p.1207-1228, 2000.

XIAO, Y.; WU, Q.; WU, W.; ZHANG, Q.; LIN, X. Controllable regioselective acylation of rutin catalyzed by enzymes in non-aqueous solvents. **Biotechnology Letters**, v.27, n.20, p.1591-1595, 2005.

CAPÍTULO 2

EFEITOS DA RADIAÇÃO SOLAR E O DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DE FORMULAÇÕES FOTOPROTETORAS INCORPORADAS DE DERIVADOS DA RUTINA

1 RESUMO

Existe a preocupação dos formuladores em desenvolver fotoprotetores de amplo espectro, possuindo reduzida concentração de filtros químicos permitidos pela legislação brasileira e de proteção elevada frente às radiações UVA e UVB. As pesquisas de novas moléculas fotoestáveis para utilização em protetores solares são extensivamente realizadas, sendo que atualmente se destaca um interesse crescente para o desenvolvimento de filtros baseados em produtos naturais, com a capacidade de absorção da radiação UV pelos cromóforos de cada molécula, associada à possível atividade antioxidante. Neste contexto, o principal objetivo deste trabalho envolveu o desenvolvimento (**4 Etapas**) de emulsões cosméticas estáveis para a incorporação de substâncias antioxidantes constituídas por rutina a 0,1% p/p, succinato de rutina a 1% p/p e succinato de metoxi-PEG-7-rutinila a 1% p/p associadas ou não a filtros químicos (7,5% p/p de 4-metoxycinamato de 2-etilhexila e 3% p/p de 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona) e filtro físico (3% p/p de dióxido de titânio). Realizou-se o desenvolvimento de 74 formulações-teste e seleção de 12 (**F23 a F28**, subdivididas em **a** e **b**) após serem submetidas a Avaliação Preliminar de Estabilidade (APE) e ao Teste de Estabilidade Acelerada (TEA), sob diversas condições de exposição. Houve a preocupação de utilizar agentes emolientes e silicones para facilitar a solubilização ou a dispersão dos filtros químicos e físicos. As bases selecionadas foram a Crodafo[®] CES (**a**) e a Hostacerin[®] SAF (**b**), sendo que as formulações contendo a succinato de metoxi-PEG-7-rutinila apresentaram comprometimento da espalhabilidade e a presença de precipitados (sinais de instabilidade), sendo rejeitadas. Na avaliação de APE (aspecto, cor e odor), nenhuma das 12 formulações apresentou modificações no teste de centrifugação sendo classificadas como normal (**N**) e apenas **F23a**, **F24ab** e **F28b** tiveram pequenas modificações quanto à sua cor inicial. A variação do valor de pH (% pH) de todas as formulações (**F23 a F28**) ficou entre 1,6-4,7%. A maioria das formulações apresentaram variações reduzidas no valor de pH na avaliação de TEA, exceto nos 3 ° (**F28a**) e 7° (**F23a** e **F24a**) dias de análise na condição de estufa (45,0 ± 0,5°C) (> 6,3%). No final do teste ciclos (-10,0/+45,0 ± 0,5°C), o valor de pH foi maior que 6,0% para **F26b** e **F28b**. Tiveram modificações leves (**LM**) em todas as condições da avaliação de TEA, exceto na condição de exposição à luz solar indireta (25,0 ± 2,0°C) quanto à intensificação da cor e diminuição do odor. Na análise do aspecto durante o TEA, ocorreram modificações quanto a espalhabilidade dificultada e ressecamento na superfície nas seguintes formulações: **F24b** nas condições de ciclos (-10,0/+ 45,0 ± 0,5°C) e freezer (-10,0 ± 0,5°C); **F26b** em todas condições exceto no refrigerador (5,0 ± 0,5°C) e **F28b** na condição de ciclos (-10,0/+ 45,0 ± 0,5°C). A formulação **F25b** apresentou formação de grumos amarelados na condição de refrigerador (5,0 ± 0,5°C), indicando que esta temperatura não seria a adequada para o armazenamento deste ativo, alterações de maior frequência na base auto-emulsificante Hostacerin[®] SAF. Perante os resultados do Teste de Estabilidade Acelerada, as formulações contendo succinato de rutina associada ou não aos filtros solares em ambas as bases foram selecionadas para a continuidade do Teste de Estabilidade Normal (TEN).

Palavras-chaves: teste de estabilidade; formulações fotoprotetoras bioativas; derivados hidrossolúveis da rutina

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Radiação ultravioleta (UVB) e (UVA) e suas características

A radiação ultravioleta (UV) é representada por uma faixa estreita do espectro eletromagnético (200-400 nm), sendo subdividida em: UVC (200-290 nm), UVB (290-320 nm), UVA II – ondas curtas (320-340 nm) e UVA I – ondas longas (340-400 nm). A radiação UVC possui elevada energia associada ao seu menor comprimento de onda, o que a torna extremamente lesiva aos seres vivos e pode provocar efeitos carcinogênicos e mutagênicos. A radiação UVC e a maior parte da UVB não chegam à superfície da Terra, devido à absorção pelo oxigênio e pelo ozônio na estratosfera, porém permite a passagem de radiação UVA (DIFFEY, 1991; KULLAVANIJAYA; LIM, 2005; RAI; SRINIVAS, 2007). A espessura da camada de ozônio não é uniforme, sendo mais espessa em direção aos pólos e mais fina na região próxima ao Equador – cada grau de latitude aumenta 3% da radiação UV que atinge a Terra. Varia também de acordo com a altitude: cada 1 km em altitude resulta o acréscimo de 10-25% de incidência da radiação UV. Estima-se que a redução de 1% da espessura da camada de ozônio aumente em 1 a 2% a mortalidade por melanoma (KULLAVANIJAYA; LIM, 2005; MARROT; MEUNIER, 2008).

A radiação UVB compreende em torno de 5% da radiação UV que atinge toda a superfície terrestre, após atravessar a atmosfera. Possui energia elevada e com grande frequência, ocasiona queimaduras solares aumentando a predisposição ao câncer de pele. A intensidade dessa radiação varia de acordo com o ângulo de inclinação do Sol com a Terra, sendo mais intensas entre 10 e 16 horas e a irradiação recebida pela Terra neste período alcança a faixa de 75%. No entanto, a radiação UVA é mais abundante e mais longa que a UVB e cerca de 95% da radiação UV alcança a superfície da Terra, sendo menos influenciada pelas condições atmosféricas. Apresenta menor energia que a radiação UVB, porém possui maior poder de penetração e atinge a derme. A proporção de radiação UV que atinge a face da Terra é de 20 (UVA) : 1 (UVB) (DIFFEY, 1991; KULLAVANIJAYA; LIM, 2005; RAI; SRINIVAS, 2007).

Alguns fatores interferem na intensidade de radiação solar que atinge a superfície terrestre, além da camada de ozônio descrita anteriormente, entre eles: (a) as nuvens não são capazes de absorver a radiação UV, mas podem dispersar os raios reduzindo sua intensidade

em até 50% em um dia muito encoberto; (b) de acordo com o tipo de superfície, a reflexão da radiação incidente difere: solo (<10%), água (~5%), neve (30-80%), areia (15-30%), mar (~25%) e grama (2-3%); (c) a poluição é capaz de bloquear a passagem de alguns comprimentos de onda, em função das partículas em suspensão ou pela absorção das radiações (KULLAVANIJAYA; LIM, 2005; RAI; SRINIVAS, 2007).

2.2 Doenças principais da pele relacionadas à radiação solar

A exposição da pele às radiações favorece a redução de concentração das substâncias antioxidantes endógenas, alterações nos lipídios das membranas celulares; inativação de sistemas enzimáticos; e modificações de constituintes proteicos, carboidratos e DNA, propiciando o desenvolvimento de patologias. Dentre estas, estão as reações inflamatórias, queratose solar, carcinoma, melanoma, sensibilização cutânea, reações fototóxicas e fotoalérgicas (HÖNIGSMANN, 2002; LAUTENSCHLAGER *et al.*, 2007).

2.2.1 Eritema ou queimadura solar

É uma resposta cutânea aguda inflamatória (vermelhidão, calor, dor e tumefação) que se inicia após um período de latência de 2 a 7 horas, quando a pele é exposta a uma dose única e intensa de radiação UVB, persistindo por horas ou dias. A intensidade máxima do eritema ocorre por volta de 2 a 24 horas, declinando em seguida. Quanto maior a dose de radiação UVB maior a persistência da reação eritematosa (HÖNIGSMANN, 2002; SIMIS; SIMIS, 2006).

2.2.2 Pigmentação solar

A resposta da pigmentação da pele após a exposição à luz é bifásica, sendo composta por (a) escurecimento pigmentar imediato (EPI) causado pela UVA e (b) pigmentação tardia causada pela UVB e o seu desaparecimento ocorre em meses ou anos (HÖNIGSMANN, 2002; SIMIS; SIMIS, 2006).

2.2.3 Queratose solar

É uma lesão pré-maligna frequente, que ocorre em áreas expostas à luz solar em pessoas idosas com pele clara: face, dorso das mãos, antebraços e couro cabeludo em indivíduos calvos. Estas lesões são maculo-papulosas recobertas por escamas secas, duras, de superfície áspera de cor amarela a castanho-escuro (0,5 a 1,0 cm) podendo formar placas (ALLEN *et al.*, 1997; SIMIS; SIMIS, 2006).

2.2.4 Carcinoma basocelular (CBC)

É uma neoplasia maligna cutânea mais comum (60% das neoplasias epiteliais malignas). Frequentemente aparecem na cabeça, pescoço e nariz como uma ferida que sangra ou descama, que cura e recidiva. Este cresce por invasão direta e muito raramente evolui com metástases. A apresentação clínica mais comum é o tipo nodular que aparece como uma pápula em forma de cúpula com telangiectasias na superfície e um bordo translúcido perolado (KRICKER *et al.*, 1995; SIMIS; SIMIS, 2006).

2.2.5 Carcinoma espinocelular (CEC)

É uma proliferação maligna dos queratinócitos da epiderme, com frequência cerca de 15% das neoplasias epiteliais malignas e com ocorrência no couro cabeludo, no dorso das mãos, no lábio inferior, nas orelhas, na face, na mucosa bucal e na genitália externa. Possui caráter invasor e pode levar à metástase, inicia-se como área queratótica infiltrada e dura ou nódulo. A lesão aumenta gradualmente e pode-se ulcerar (ALLEN *et al.*, 1997; SIMIS; SIMIS, 2006).

2.2.6 Melanoma maligno

A incidência deste tumor cutâneo praticamente triplicou entre brancos durante os últimos 40 anos (DE FABO *et al.*, 2004; FITZPATRICK *et al.*, 2005; SIMIS; SIMIS, 2006). Vários fatores estão sendo estudados para a sua gênese: genéticos, exposição à radiação UVA e UVB e hormonais. Ele está subdividido em:

(a) **melanoma disseminativo superficial** (lesão névica precursora) – lesão leve, elevada, margens irregulares, variação da cor de acastanhada a negra com áreas azuladas,

esbranquiçadas, acinzentadas e vermelhas. Representa 70% dos melanomas (DE FABO *et al.*, 2004; SIMIS; SIMIS, 2006);

(b) **lentigo maligno melanoma** – lesão do tipo efélide, maculosa, de forma irregular, com diferentes tonalidades de cor, com surgimento de nódulos irregularmente pigmentados. Ocorre em áreas da pele de idosos expostas ao sol (DE FABO *et al.*, 2004; FITZPATRICK *et al.*, 2005; SIMIS; SIMIS, 2006);

(c) **melanoma nodular** – lesão nodular ou em placas ou polipoide de coloração negro-azulada de evolução rápida, sendo localizadas nos troncos dos homens e nas pernas das mulheres. Representam 15 a 30% dos melanomas (FITZPATRICK *et al.*, 2005; SIMIS; SIMIS, 2006);

(d) **melanoma lentiginoso acral** – ocorre nas regiões palmares, plantares e falanges terminais. É mais comum em negros e asiáticos e mais frequentemente em indivíduos idosos (DE FABO *et al.*, 2004; FITZPATRICK *et al.*, 2005; SIMIS; SIMIS, 2006).

Tem maior risco com UVB 290 a 320 nm e está relacionado a exposições agudas e intermitentes.

2.3 Envelhecimento cutâneo e os efeitos da radiação UV

O envelhecimento da pele é um fenômeno biológico complexo, subdividido em: intrínseco (determinação genética) e extrínseco, que envolve a exposição a radiação UV e a outros fatores ambientais, como poluição; componentes do cigarro e alimentação (JENKINS, 2002).

O envelhecimento intrínseco é influenciado por 4 processos, tais como: controle metabólico, resistência ao estresse, desregulação gênica e estabilidade genética. Referente ao metabolismo pode ocorrer interferência pela desordem na regulação neuroendócrina da secreção dos hormônios: luteinizante (LH), folículo estimulante (FSH), adrenocorticotrópico (ACTH) e do crescimento (GH). Associado ao descrito, ocorre um processo caracterizado por senescência celular, que se inicia por um encurtamento telomérico e a consequente ativação das proteínas reguladoras (proteína quinase e supressora de tumor p53). As células senis são controladas por telômeros, que são repetições de bases sequenciais terminais do DNA: timina-

timina-adenina-guanina-guanina-guanina (TTAGGG) e protegem o final de cada cromossomo contra danos diversos (JENKINS, 2002; QUIROGA, 2005).

O estresse oxidativo está relacionado ao desequilíbrio (excesso) da formação de radicais livres e tem importância primária no processo de envelhecimento, tanto intrínseco quanto extrínseco, por influenciar a modulação de genes (redução/oxidação) e interagir por reações radicalares com o DNA, proteínas, lipídeos e carboidratos. Estas espécies reativas que participam do estresse oxidativo são formadas num processo aeróbico e denominadas espécies reativas de oxigênio (ROS), dentre elas, temos: radical hidroxila ($\text{OH}^\bullet$), ânion radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), óxido nítrico ($\text{NO}^\bullet$) e radical peroxila ($\text{ROO}^\bullet$), e também os não radicais como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ozônio (O_3), oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) e ácido hipocloroso (HOCl). Estes radicais são importantes à vida e atuam em sistema de equilíbrio, pois participam e promovem uma série de reações necessárias à manutenção do organismo (respiração celular, equilíbrio oxidante/antioxidante e defesa imunológica) (ARUOMA, 1994; FERREIRA; MATSUBARA, 1997; HALLIWELL, 1994; JENKINS, 2002).

Como consequência do processo do envelhecimento intrínseco cutâneo, temos: (a) redução da atividade biossintética das células presentes na pele devido à alteração de expressão de moléculas que regulam o crescimento celular de fibroblastos, queratinócitos, melanócitos e linfócitos; (b) aumento da degradação de fibras elásticas (papila dérmica) e colágeno (matriz dérmica), devido à redução de inibidores das metaloproteases e consequente expressão destas. As metaloproteases (MMPs) representam uma classe de enzimas responsáveis pela degradação da matriz dérmica extra-celular, como as collagenases (MMP1), gelatinases (MMP2 e MMP9) e estromelisina (MMP3). Agem em associação, degradando completamente as fibras de colágeno e de elastina e são reguladas por inibidores localizados na matriz como TIMP1 e TIMP3. Além disso, (c) ocorre o enfraquecimento dos vasos superficiais e a diminuição da superfície de contato entre a derme e epiderme, desencadeando a desnutrição da epiderme e desregulação térmica; (d) menor formação da camada córnea com maior exposição aos micro-organismos e irritações (ARUOMA, 1994; JENKINS, 2002; QUIROGA, 2005; TAYLOR; 2005).

Uma das principais causas do envelhecimento extrínseco ou fotoenvelhecimento está relacionada com a exposição à radiação solar ultravioleta (UVA e UVB), que estimula o processo da senescência celular, contribuindo em 80% do envelhecimento facial. A interação da radiação UV com a pele acontece por meio da absorção dos cromóforos celulares existentes, tais como DNA, porfirinas, ácido urocânico (filtro químico) e aminoácidos

aromáticos. Dependendo da intensidade, do tempo de exposição e do tipo de radiação UV, estes cromóforos, quando excitados, podem reagir com o oxigênio molecular, e resultar em maior quantidade de espécies reativas de oxigênio (ROS), ocasionando alteração da homeostasia cutânea ou transformar-se em subprodutos com alteração de suas funções originais (ARUOMA, 1994; GREITER; GSCHNAIT, 2008; HALLIWELL, 1994; TAYLOR, 2005).

Em torno de 90% da radiação UV solar é constituída de UVA e, por apresentar um comprimento de onda maior pode penetrar até a derme, podendo causar necrose das células endoteliais, danos aos vasos de pequeno calibre da região da pele, modificações estruturais ao DNA e está relacionada a 67% do melanoma maligno (INCA, 2008; SVOBODOVÁ; PSOTOVÁ; WALTEROVÁ, 2003). A exposição à radiação UVA acelera o processo de produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), oxigênio singlete (1O_2) e radicais livres hidroxila ($OH^\bullet$). A radiação UVB corresponde a 4 a 5% da luz ultravioleta, e age, principalmente, nas camadas das células basais da pele e é ativamente genotóxica, podendo propiciar o carcinoma. Também induz direta ou indiretamente a formação de fotoprodutos pirimídicos; fotoisomerização do ácido *trans* urocânico (*t*-UA) para a forma *cis* (*c*-UA)-fator imunossupressor, realizando ações como a supressão da função antígeno e de interleucinas (IL-1 β , IL-2) e pode aumentar o risco de câncer de pele não-melanômico em modelo animal. Esta reação de fotoisomerização pode ocorrer no intervalo de 260 a 340 nm (ARUOMA, 1994; GREITER; GSCHNAIT, 2008; McLOONE *et al.*, 2005; NOONAN; DE FABO, 1992; TAYLOR, 2005).

Além do estresse oxidativo, existe a influência da suscetibilidade genética e a pigmentação da pele. Alguns destes mecanismos de defesa saturam e deixam de exercer plena eficácia nesta proteção, manifestando sinais diversos, como: espessamento da epiderme; processo inflamatório caracterizado pelo aparecimento de eritema ou queimaduras de graus variados; ativação dos melanócitos na síntese de melanina caracterizado pela pigmentação ou bronzeamento (oxidação da melanina); redução da firmeza, da elasticidade e da hidratação da pele. Estas alterações estão relacionadas à exposição aguda às radiações UVB (290-320 nm) e podem ocasionar o fotoenvelhecimento e a exacerbação de dermatoses fotossensíveis (GASPARRO, 2000; GREITER; GSCHNAIT, 2008; LAUTENSCHLAGER *et al.*, 2007; MATSUMURA; ANANTHASWAMY, 2002; TORNALETTI; PFEIFER, 1996; WLASCHEK *et al.*, 2001; WOLF *et al.*, 2001). Outras modificações incluem a mobilização de células especializadas, como neutrófilos, seguida da ativação do sistema NADPH oxidase,

o que gera série de espécies reativas do oxigênio. Como resultado, ocorre alteração no sistema imunológico, diminuindo sua capacidade de eliminar as células alteradas, devido às mudanças na produção de citocinas pelos queratinócitos. Os efeitos crônicos relacionados à exposição à radiação UV modificam a expressão gênica de moléculas de adesão e consequentemente há a perda de funções celulares como o aumento da expressão do gene p53, que induz apoptose de queratinócitos irradiados (GREITER; GSCHNAIT, 2008; JENKINS, 2002; TORNALETTI; PFEIFER, 1996; WLASCHEK *et al.*, 2001).

As manifestações cutâneas apresentadas pelo envelhecimento intrínseco incluem uma pele lisa, pálida com linhas finas e perda da hidratação. No entanto, o envelhecimento induzido por exposições repetidas à radiação UV (extrínseco) propicia o aparecimento de uma pele áspera, seca, enrugada com sulcos profundos, apresentação de lesões pré- e cancerosas e alterações de pigmentação (hiper- e hipomelanose, éfelides, queratoses seborreicas pigmentadas). Estas informações estão sintetizadas no **Quadro 1** (QUIROGA, 2005).

Estas diferenças são ressaltadas por um estudo realizado pelo cirurgião plástico de Nova York, Dr. Darrick E. Antell (TAYLOR, 2005), que avaliou duas irmãs gêmeas, uma com exposição abusiva à luz solar sem o uso de fotoprotetor e a outra com uma exposição controlada usando o protetor solar (**Figura 2**).

Quadro 1 – Características clínicas do envelhecimento intrínseco e extrínseco (fotoenvelhecimento) (QUIROGA, 2005)

Características clínicas	Envelhecimento intrínseco	Fotoenvelhecimento
Pigmentação	Hipopigmentação: pele clara e pálida	Hiperpigmentação: dispersadas em certas regiões mais expostas
Rugas	Linhas finas	Sulcos profundos
Hidratação	Secura e descamação	Secura e aspereza
Formação de Tumores	Benigno	Associação do benigno com o maligno

Figura 2. Manifestações do fotoenvelhecimento após repetidas exposições à radiação UV em irmãs gêmeas de 50 anos: **(a)** significativa exposição solar, indicando proeminente enrugamento e **(b)** comparado com sua irmã que, também foi exposta à radiação UV, porém, fazendo o uso de fotoprotetor (TAYLOR, 2005)

Além destas interações prejudiciais da radiação com a pele, existem alguns benefícios conferidos à radiação solar (UV-B) como o estímulo da síntese da vitamina D, pela conversão de 7-deidrocolesterol na epiderme que se isomeriza em vitamina D₃, numa reação controlada pela temperatura do corpo em 2 a 3 dias. É necessário o transporte desta vitamina ao fígado para ser metabolizada em 25-hidroxivitamina D. Para que ocorra este processo, a exposição ao sol deve ser realizada por pelo menos 15 minutos, considerando da primavera ao outono (DIFFEY, 1991). A vitamina D também favorece a circulação sanguínea por meio da vasoconstrição e vasodilatação e tem grande importância na saúde óssea pois fazo transporte do cálcio; e atua no tratamento de algumas dermatoses como: psoríase, vitiligo, icterícia neonatal e leishmaniose tegumentar (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2004).

2.4 Mecanismos de proteção da pele contra os danos da radiação UV

As condições da pele podem ser consideradas indício do estado de saúde e do bem-estar físico e mental do indivíduo, com influência direta na aparência e consequentemente, interferindo nos relacionamentos sociais e profissionais. Ela recobre a superfície do corpo e apresenta-se constituída por uma porção epitelial, a epiderme, e uma porção conjuntiva, a

derme. É um dos maiores órgãos, atingindo em torno de 16% do peso corporal e apresenta as seguintes funções, como: proteção dos órgãos, nutrição, pigmentação, queratogênese, termorregulação, transpiração, permeabilidade seletiva às substâncias, plasticidade e reflete estados emocionais (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; WIECHERS, 2005).

A epiderme (**Figura 3A**) é constituída por um epitélio estratificado, pavimentoso, e queratinizado e é dividida em camadas: (a) basal - apresenta intensa atividade mitótica e é responsável pela renovação da epiderme; (b) espinhosa - células com expansões citoplasmáticas (desmossomas) que mantêm a coesão e a resistência ao atrito. Nestas duas camadas existe a presença de melanócitos, responsáveis pela produção da melanina; (c) granulosa - secreção de substância fosfolipídica associada às glicosaminoglicanas, que impede a passagem de certas substâncias e confere grande resistência à membrana celular; (d) lúcida: uma camada fina de células unidas por desmossomas; (e) córnea - formada pela sobreposição de células queratinizadas e anucleadas sendo a camada mais superficial da epiderme e funciona como uma barreira à perda de água do organismo para o meio ambiente e contra a penetração de substâncias. Adicionalmente, a epiderme apresenta outros tipos de células como as de Langerhans (sistema imunitário da pele), as de Merkel (receptores sensoriais – tato e mecânicos - pressão), as de Krause (termorreceptores – frio), as de Ruffini (termorreceptores – calor), as de Vater-Pacini (mecanorreceptores – pressão), as de Meissner (receptores sensoriais – tato) e as terminações nervosas livres associadas principalmente à dor (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

A derme (**Figura 3B**) é o tecido que dá sustentação à epiderme, elasticidade e oferece nutrição da pele, pois existe a presença de vasos sanguíneos e linfáticos; fibras de colágeno, elastina e reticulina; anexos, como: pelos, glândulas sebáceas e sudoríparas, unhas; elementos celulares, como: histiócitos, fibroblastos, mastócitos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Figura 3. (A) Esquema detalhado da epiderme humana indicando as várias camadas, ressaltando o melanócito. (B) Esquema ampliado da pele humana indicando as espessuras das partes da pele

Fonte: WIECHERS, 2005.

No organismo humano os sistemas naturais de proteção à radiação UV e de prevenção aos danos solares estão presentes na pele e são formados pelas substâncias que compõem o manto hidrolipídico, como: ácido urocânico (filtro químico), ácidos graxos livres, ácido ascórbico, α -tocoferol e superóxido dismutase; melanina (pigmentação cutânea) e pela camada córnea (efeito barreira física) (KULLAVANIJAYA; LIM, 2005; TORNALETTI; PFEIFER, 1996).

Na secreção sudorípara, existe um componente localizado na epiderme (estrato córneo), o ácido urocânico (ácido 4- imidazoilacrílico) (**Figura 4**), cujas propriedades absorventes se situam próximo à faixa das radiações UVB, com máximo de absorção em 277 nm (KULLAVANIJAYA; LIM, 2005; McLOONE *et al.*, 2005; NOONAN; DE FABO, 1992).

Figura 4. Estrutura química do ácido urocânico: transformação da forma de *trans* para *cis* (KULLAVANIJAYA; LIM, 2005)

O ácido ascórbico (vitamina C) é encontrado na maioria dos fluidos corporais, sob a forma de ascorbato e atua em nível de membrana celular como antioxidante hidrossolúvel, sequestrando radicais, entre eles: $^1\text{O}_2$, $\text{HO}^\bullet$, $\text{O}_2^{\bullet-}$, $\text{HO}_2^\bullet$, HOCl e reduzindo nitrosaminas carcinogênicas (ARUOMA, 1994; BARBER; HARRIS, 1994). A vitamina E consiste de 4 tocoferóis e 4 tocotrienóis, sendo o maior antioxidante lipossolúvel de quebra de cadeia e, também, sequestrador de radicais peroxilas. O α -tocoferol é o mais abundante e bioativo *in vivo* do grupo, seguido pelo γ -tocoferol. O grupo cromanol é o responsável pela atividade antioxidante, e a provável função da longa cadeia carbônica em sua estrutura é reter a molécula na membrana celular. A estrutura do α -tocoferol está representada na **Figura 5** (ARUOMA, 1994; BRIVIBA; SIES, 1994). Age contra os radicais livres como $\text{O}_2^{\bullet-}$, $\text{OH}^\bullet$, $^1\text{O}_2$, radicais peroxilas lipídicos, $\text{NO}^\bullet$, $\text{N}_3^\bullet$, $\text{Br}_2^\bullet$, $\text{CCl}_3\text{COO}^\bullet$ (ARUOMA, 1994).

Figura 5. Estrutura química do α -tocoferol (ARUOMA, 1994)

A superóxido-dismutase corresponde a uma família de enzimas com diferentes grupos prostéticos em sua estrutura, como a forma SOD-cobre-zinco presente no citosol e SOD-manganês localizada na mitocôndria. Ela catalisa a dismutação do radical superóxido em H_2O_2 e O_2 , na presença do próton H^+ (BARBER; HARRIS, 1994).

A melanina (eumelanina) é o pigmento biológico presente na epiderme, cabelos e olhos, e sua síntese ocorre no interior dos melanócitos pela ação da enzima tirosinase. Protege as células por meio de vários mecanismos, entre eles: excitação com absorção da radiação UV e visível (250-1200 nm) e retorno ao estado fundamental liberando energia na região do espectro infravermelho (calor); refletindo; e dispersando a radiação UV incidente. Nas células epiteliais, os grânulos de melanina localizam-se na posição supranuclear (em torno) e oferecem máxima proteção ao DNA contra a radiação UV (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; KULLAVANIJAYA; LIM, 2005). A cor da pele resulta de vários fatores, entre eles: tipo e conteúdo em melanina e de caroteno, quantidade de capilares e a cor do sangue localizado nos capilares da derme.

A camada córnea (ou estrato córneo), por ser a camada mais externa da epiderme, reflete entre 5 e 10% da luz incidente. A região da pele onde se localiza é fina, o que a torna muito mais sensível à radiação UV e pode ser queimada ou lesionada com maior facilidade do que as demais camadas mais espessas (AFAQ *et al.*, 2005).

2.5 Formulações fotoprotetoras: componentes, tipos e importância

Quando se trata da exposição solar, deve-se considerar dois aspectos de interação com o ser humano: o estético e o relacionado à saúde. As radiações UVA e UVB estão associadas ao dano cumulativo na pele durante os anos de vida que o indivíduo ficou exposto, induzindo respostas biológicas e modificações que estão direta ou indiretamente envolvidas com o desenvolvimento do câncer de pele, considerado o problema de maior gravidade quando comparado aos de ordem estética. As alterações incluem a formação de eritema, edema, bronzeamento, hiperplasia, imunossupressão, danos ao DNA, fotoenvelhecimento e melanogênese (SVOBODOVÁ; PSOTOVÁ; WALTEROVÁ, 2003). Segundo dados do Instituto Nacional do Câncer, o carcinoma basocelular e epidermoide são os mais comuns e correspondem a 70% e 25%, respectivamente, dos casos totais de câncer de pele (INCA, 2010). Ainda conforme o INCA, em 2010 no Brasil, ocorreram cerca de 115.000 novos casos (55 mil em homens e quase 60 mil em mulheres) de câncer de pele por exposição ao sol. O câncer de pele não melanoma é mais frequente em adultos, com picos de incidência por volta dos 40 anos. O do tipo melanoma tem incidência menor (cerca de 4% dos casos), entretanto, corresponde à maioria dos casos de morte por câncer de pele. A média mundial da sobrevida estimada para pacientes com melanoma é de 69% em cinco anos. A estimativa, segundo o INCA, é de 5930 novos casos em 2010, sendo 2960 em homens e 2970 em mulheres. As maiores taxas encontram-se na região Sudeste e Sul. O câncer de pele, que não o melanoma cutâneo, apresenta as maiores taxas de incidência em Goiânia (117,33/100.000 homens e 84,06/100.000 mulheres). Esse tipo de câncer atinge principalmente pessoas entre 30 e 60 anos de idade (INCA, 2010).

Assim, o uso de fotoprotetores, além de cuidar da aparência do indivíduo retardando os sinais do envelhecimento extrínseco, é fator de prevenção no câncer cutâneo, o que os tornam produtos abordados sob diversos focos e de uso essencial. Neste contexto, na **Quadro 2** estão apresentadas as características dos tipos de peles quanto à fotossensibilidade e o tipo de fator

de proteção (FPS) recomendado para cada classificação de pele, segundo Fitzpatrick, Pathak e Parrish (1974).

Quadro 2 – Fototipos de pele e Fatores de Proteção Solar (FPS) recomendados

Tipos de pele*	Fotossensibilidade da pele à radiação solar (UV-A e UV-B)*	Histórico de queimadura solar e bronzeamento*	Proteção e FPS recomendado
I – Branca	Extremamente Sensível	Nunca bronzeia e sempre queima facilmente	Muito alta: ≥ 20 e ≥ 30 (a) ≥ 20 (b)
II – Branca	Muito Sensível	Bronzeia minimamente e sempre queima facilmente	Alta: ≥ 12 e < 20 (a,b)
III – Morena Clara	Sensível	Bronzeia gradualmente e queima moderadamente	Moderada: ≥ 8 e < 12 (a) ≥ 6 e < 12 (b)
IV – Morena Moderada	Moderadamente Sensível	Sempre bronzeia bem e queima minimamente	Moderada: ≥ 4 e < 8 (a) Sem recomendação (b)
V – Morena Escura	Pouco Sensível	Bronzeia intensamente e raramente queima	Baixa: ≥ 2 e < 4 (a) ≥ 2 e < 6 (b)
VI – Negra	Não Sensível	Pele profundamente pigmentada, nunca queima	Sem recomendação (a,b)

Legenda: Esta tabela foi projetada de uma adaptação de dados * da literatura de Fitzpatrick, Pathak e Parrish (1974); (a) segunda FDA (UNITED STATES, 1999); (b) AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2002.

Os fotoprotetores contêm substâncias responsáveis por prevenir ou minimizar os efeitos prejudiciais da radiação solar na pele humana por absorção e/ou reflexão e/ou espalhamento da radiação UV. Estas substâncias são utilizadas em sua grande maioria em produtos apresentados sob formas emulsionadas, considerados cosméticos pela Legislação Brasileira, e devem ser homogêneos; estáveis; resistentes à água; não gorduroso, não ressecante ou não irritante à pele; seguro; econômico; e de fácil aplicação (BARON *et al.*, 2008; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2002; DIFFEY, 1991; MILESI; GUTERRES, 2002; URBACH, 2000).

Estas substâncias contidas nos fotoprotetores podem ser filtros solares químicos (orgânicos) ou físicos (inorgânicos). Os primeiros são substâncias cromóforas capazes de absorver a energia eletromagnética na região do ultravioleta (energia maior - estado excitado)

e emitir-la sob outra forma, geralmente, na faixa do infravermelho (superior a 800 nm) gerando calor, com energia menor (estado fundamental) e inofensiva ao ser humano. Pode, também, emitir-la na faixa do visível (400 nm a 800 nm) e gera fluorescência. Após a liberação de energia, a molécula deve retornar a sua conformação inicial, para realizar o ciclo absorção/liberação novamente. Quando isso não ocorre, pode-se dizer que o filtro é fotoinstável. Estes cromóforos são compostos aromáticos com grupos carboxílicos (receptores de elétrons) e apresentam um grupo doador de elétrons, em geral, uma amina, uma hidroxila ou um grupo metoxila, na posição *orto* ou *para* do anel aromático. Em relação à estrutura eletrônica dos filtros orgânicos, quanto maior a eletronegatividade do grupo receptor de elétrons, maior a desestabilização da estrutura do anel benzênico e menor a diferença de energia entre o estado excitado e o estado fundamental. Como o comprimento de onda é inversamente proporcional à energia, a diminuição na diferença de energia propicia um aumento no comprimento de onda de absorção da energia. Um exemplo seria o butil metoxidibenzoil-metano, que não tem a presença do grupo doador de elétrons e o COCH_2COH é o grupo receptor eletronegativo. Neste caso, existe a menor diferença de energia entre o estado excitado e o fundamental e como consequência, sua banda de absorção é a que ocorre em maiores comprimentos de onda, região UVA (FLOR *et al.*, 2007; LEVY, 2001).

Estes filtros são classificados de acordo com o tipo de radiação que protegem, entre eles, filtros ou absorvedores UVA e/ou UVB, absorvem radiações compreendidas entre 320 – 360 nm e 290 – 320 nm, respectivamente. Como os filtros solares absorvem apenas parte da região do ultravioleta (UVA ou UVB), para se ter uma proteção completa deve-se realizar uma combinação entre estes filtros, que pode causar alto grau de irritabilidade quando aplicada na pele. Uma complementação na proteção quanto à radiação UVA (acima de 360 nm) é necessária a incorporação dos filtros físicos pois estes irão espalhar, refletir além de absorver a radiação ultravioleta (BARON *et al.*, 2008; FLOR *et al.*, 2007; LEVY, 2001; RAI; SRINIVAS, 2007).

Nos protetores inorgânicos, os processos de proteção solar envolvem a absorção, a dispersão e a reflexão da radiação apresentando inespecificidade quanto às radiações UVA e UVB, pois estes mecanismos dependem do tamanho das partículas (pigmentos inorgânicos) suspensas em uma formulação. Sendo o tamanho destas partículas de suma importância não apenas para a eficácia do protetor solar, mas também, para a aparência e aceitação do produto cosmético. Para o mecanismo da reflexão, são necessárias partículas grandes (200 a 500 nm) e deixam o aspecto na pele esbranquiçado, porém difundem a luz com maior eficiência. No caso do óxido de zinco, a eficiência máxima de difusão é atingida com partículas de cerca de

800 nm de diâmetro. No caso do dióxido de titânio, o melhor tamanho para difusão é de 250 nm de diâmetro (ARAUJO; SOUZA, 2008; BARON *et al.*, 2008; FLOR *et al.*, 2007; GONTIJO *et al.*, 2009). Para não ocorrer a formação da película branca sobre a pele, o tamanho de partículas não pode ser da mesma ordem de grandeza do comprimento de onda da faixa da radiação visível, assim as partículas devem ser menores que 400 nm. Para isto, as indústrias começaram a desenvolver tamanhos de partículas de filtros físicos menores entre 60-80nm, sem que houvesse perdas significativas na eficácia do produto. Além disso, uma outra propriedade importante que deve ser analisada é o índice de refração, pois quanto maior o índice de refração do pigmento mais difícil torná-lo transparente em produtos acabados, pois esta característica é o contraste enxergado pelo olho humano entre a partícula e o ar que a cerca (ARAUJO; SOUZA, 2008; GONTIJO *et al.*, 2009).

Por outro lado, para o mecanismo de melhor dispersão ou absorção da radiação UV, o adequado é a incorporação nas formulações de partículas menores, micronizadas ou ultrafinas (10 a 50 nm) (ARAUJO; SOUZA, 2008). Estas têm uma aceitação cosmética maior, porém a proteção contra a radiação UVA é prejudicada além de uma maior agregação das partículas por um efeito eletrostático, reduzindo a eficácia da fotoproteção. Este problema de instabilidade pode ser melhorado por um processo de revestimento (dimeticona ou sílica), mantendo estas partículas dispersas (ARAUJO; SOUZA, 2008; BARON *et al.*, 2008; FLOR *et al.*, 2007; RAI; SRINIVAS, 2007).

Estas substâncias orgânicas podem ser classificadas por semelhança estrutural e espectro de absorção, e apesar da legislação apresentar várias substâncias aprovadas, somente as mais usadas estão listadas no **Quadro 3** (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2006; ARAUJO; SOUZA, 2008; KULLAVANIJAYA; LIM, 2005; LEVY, 2001; LOWE, 2006; RAI; SRINIVAS, 2007; ROELANDTS, 1998; TUCHINDA *et al.*, 2006).

Quadro 3 – Descrição dos tipos de filtros químicos e físicos, suas propriedades físico-químicas e a sua máxima concentração permitida segundo a legislação vigente (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2006) (continua)

Classe dos Filtros Solares	Nome químico	Nome INCI/ Sigla	CMA %	Propriedades físico-químicas
FQ- UVB				
Ésteres do ácido <i>para</i> -aminobenzoico (PABA) (FQ)	4-Dimetil-aminobenzoato de 2-etil-hexila Padimato O	Ethylhexyl dimethyl PABA (EHDP)	8,0	O PABA foi patenteado em 1943, é hidrossolúvel e muito efetivo frente à UVB (5%). $\lambda_{\text{máx}}$ 283 nm (etanol). Uso limitado por deixar as vestimentas amareladas, causar reações de foto-alergenicidade e ser potente carcinogênico <i>in vitro</i> . O seu derivado (ethylhexyl dimethyl PABA) é compatível com diversos veículos, apresenta baixo potencial de reações diversas comparado ao PABA. $\lambda_{\text{máx}}$ 311 nm (etanol). É efetivo frente à radiação UVB ^(b,c,d) .
Derivado dos cinamatos (FQ)	4-Metoxicinamato de 2-etil-hexila (Octinoxate)	Ethylhexyl methoxycinnamate (EHMC)	10,0	Filtro absorvedor UVB, lipossolúvel e solvente para demais filtros orgânicos sintéticos sólidos lipossolúveis. $\lambda_{\text{máx}}$ 311 nm (etanol). Pode ser associado com outros filtros UV para atingir um FPS alto. Pode ser encapsulado em dispersão aquosa que proporciona fotoestabilidade aumentada, reduz a pegajosidade e tem baixo potencial alergênico ^(b,c,d) .
Derivados dos salicilatos (FQ)	Salicilato de homomentila (Homosalate)	Homomenthyl salicylate (HMS)	15,0	Filtros absorvedores UVB fracos e devem ser utilizados em alta concentração, lipossolúveis, estáveis, com boas propriedades de solubilização de filtros sólidos orgânicos. Além disso, diminuem a fotodegradação da oxibenzona e avobenzona. EHS e HMS apresentam picos de absorção com λ máximos em 307 e 306 nm, respectivamente ^(b,c,d,f) .

Quadro 3 – Descrição dos tipos de filtros químicos e físicos, suas propriedades físico-químicas e a sua máxima concentração permitida segundo a legislação vigente (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2006) (**continuação**)

Derivados dos salicilatos (FQ) continuação	Salicilato de 2-etil-hexila (Octisalate)	Ethylhexyl salicylate (EHS)	5,0	
Fenil-benzimidazolsulfonatos (FQ)	Ácido-2-fenilbenzimidazol-5-sulfônico (Ensulizole)	Phenylbenzimidazole sulfonic acid (PBSA)	8,0 (expresso como ácido)	É um filtro absorvedor UVB, hidrossolúvel após neutralização, fotoestável, apresenta efeito sinérgico com filtros químicos lipossolúveis (avobenzona, 4-metoxicinamato de 2-etil-hexila e salicilato de homomentila) e filtros físicos. $\lambda_{\text{máx}}$ 310 nm (água) ^(a,d) . pH ideal: 7,0-7,5.
(FQ)	2-Ciano-3,3'-difenilacrilato de 2-etil-hexila	Octocrylene (OCR)	10,0 (expresso como ácido)	Filtro solar absorvedor UVB, lipossolúvel, fotoestável e com boas propriedades de dissolução de filtros orgânicos sólidos. Auxilia na estabilização do 4-metoxicinamato de 2-etil-hexila e da avobenzona. $\lambda_{\text{máx}}$ 303 nm (etanol) ^(b,c,d) .
Derivados da cânfora (FQ)	3-(4'-Metilbenzilideno)-d-l-cânfora (Enzacamene)	4-Methylbenzylidene camphor (4-MBC)	4,0	Absorvedor moderado UVB, lipossolúvel e fotoestável quando associado com avobenzona. $\lambda_{\text{máx}}$ 300 nm (etanol). Há estudos contraditórios quanto ao seu efeito estrogênico ^(b,c,d) .

Quadro 3 – Descrição dos tipos de filtros químicos e físicos, suas propriedades físico-químicas e a sua máxima concentração permitida segundo a legislação vigente (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2006) (**continuação**)

<p>Iscotrizinol (FQ)</p>	<p>Ácido benzóico, 4,4'-[[6-[[4-[(1,1-dimetil-etil)amino]carbonil]fenil]amino]-1,3,5-triazina-2,4-diil]diimino]bis-,bis(2-etil-hexil)</p>	<p>Diethylhexyl triazone (DBT) butamido</p>	<p>10,0</p>	<p>Absorvedor UVB lipossolúvel. $\lambda_{\text{máx}}$ 312 nm em etanol. Pode ser associado com dióxido de titânio e óxido de zinco^(a,d). É aprovado na Europa e em outros países, porém sem aprovação pela FDA. Nome comercial: Uvasorb[®] HEB</p>
<p>Octyl triazone (FQ)</p>	<p>2,4,6-Trianilin-(p-carbo-2'-etil-hexil-1'-oxi)-1,3,5-triazina</p>	<p>Ethylhexyl triazone (EHT)</p>	<p>5,0</p>	<p>Absorvedor UVB lipossolúvel. $\lambda_{\text{máx}}$ 218 e 314 nm em etanol. Pode ser associado a óxido de zinco promovendo um aumento do valor de FPS utilizando uma concentração baixa de filtros^(a,d). É aprovado na Europa e em outros países, porém sem aprovação pela FDA. Nome comercial: Univil T-150[®].</p>

Quadro 3 – Descrição dos tipos de filtros químicos e físicos, suas propriedades físico-químicas e a sua máxima concentração permitida segundo a legislação vigente (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2006) (**continuação**)

<p>Diethylbenzylidene dimethicone (FQ)</p> <p>--- R =</p> <p>92.1 – 92.5% --- CH3</p> <p>approx. 6% </p> <p>approx. 1.5% </p> <p>n = 60</p>	<p>Dimeticodietilbenzalmalonato</p>	<p>Polysilicone-15 (PS15)</p>	<p>10,0</p>	<p>Absorvedor UVB lipossolúvel. $\lambda_{\text{máx}}$ 310 nm em etanol. Devido à sua longa cadeia molecular, tem mínima penetração na pele. Protege a pele e o cabelo contra os danos causados pela radiação. Protege os cabelos tingidos, contra os danos do uso diário do secador e realça o brilho^(a,d). É aprovado na Europa e em outros países, porém sem aprovação pela FDA, apresenta baixa absorção e devem ser combinado com outros filtros. Nome comercial: Parsol SLX®.</p>
<p>Amiloxate (FQ)</p>	<p>4-Metoxicinamato de isopentila</p>	<p>Isoamyl p-methoxycinnamate (IMC)</p>	<p>10,0</p>	<p>Absorvedor UVB lipossolúvel. $\lambda_{\text{máx}}$ 308 nm em etanol. Pode ser usado em formulações com resistência a água. Apresenta efeito sinérgico com 4-metoxicinamato de 2-etil-hexila havendo um aumento no valor de FPS. Pode ser usado como solvente numa concentração de 25% para o filtro 4- methylbenzylidene camphor, 34% para o filtro ethylhexyl triazone e 26% para o filtro benzophenone-3^(a,d). Nome comercial: Neo Heliopan E1000®.</p>

Quadro 3 – Descrição dos tipos de filtros químicos e físicos, suas propriedades físico-químicas e a sua máxima concentração permitida segundo a legislação vigente (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2006) (**continuação**)

FQ – UVA				
Derivado benzofenônico (FQ)	2-Hidroxi-4-metoxibenzofenona (Oxibenzona)	Benzophenone-3 (BP3)	10,0	Ambos os filtros apresentam amplo espectro: filtro UVA II e secundário UVB. Podem ser aplicados como fotoestabilizadores de cor em formulações cosméticas. BP4 é hidrossolúvel quando neutralizado, $\lambda_{\text{máx}}$ em 366 nm ^(b,c,d,f) . Podem ser absorvidos pela pele e promover a geração de radicais livres. BP3 é lipossolúvel, fotolábil, pode ser oxidado rapidamente e inativar os sistemas antioxidantes. Esta por ser muito instável deve ser associada com outros ingredientes ativos, como o octocrileno. Possui dois picos de absorção com λ máximos em 288 e 325 nm ^(b,c,d,f) .
	Ácido 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona-5-sulfônico (Sulisobenzona)	Benzofenona-4 (BP4)	10,0 (expresso em ácido)	

Quadro 3 – Descrição dos tipos de filtros químicos e físicos, suas propriedades físico-químicas e a sua máxima concentração permitida segundo a legislação vigente (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2006) (**continuação**)

<p>Derivados dos ésteres do ácido antranílico (FQ)</p>	Antranilato de mentila (Ensilizole/Meradimate)	Methyl anthralinate (MA)	5,0	Ampla espectro: filtro fraco UVA e secundário UVB; estável, seguro e não exibe efeito solvente significativo. $\lambda_{\text{máx}}$ 340 nm (etanol). Levemente solúvel em água, solúvel em álcool e propilenoglicol, insolúvel em glicerina e óleo mineral ^(b,c,d) .
<p>Derivado dibenzoilmetano (FQ)</p> <p>(FQ)</p>	<p>1-(4-Terc-butilfenil)-3-(4-metoxifenil)propano-1,3-diona (Avobenzona)</p> <p>Sal monossódico do ácido 2,2'-bis-(1,4-fenileno)-1H-benzimidazol-4,6-dissulfônico</p>	<p>Butyl methoxydibenzoylmethane (BMBM)</p> <p>Dissodium phenyl dibenzimidazole tetrasulfonate (DPDT)</p>	<p>5,0</p> <p>10,0 (expresso como ácido)</p>	<p>Absorvedor UVA I e amplo espectro em associação com filtros UVB. Incompatibilidade com <i>p</i>-metoxicinamato de octila (fotoestável), com sais férricos, metais pesados e derivados do PABA. pH ideal: 5,0 – 8,0 e é lipossolúvel. $\lambda_{\text{máx}}$ 357 nm (etanol) e absorção alta acima de 380 nm. Fotodegradação após 1 hora ao sol (evitada com associação com octocrileno), derivados de salicilatos, 4-MBC, óxido de zinco ou dióxido de titânio micronizados^(a,d).</p> <p>Absorvedor UVA II, fotoestável e apresenta sinergia com octocrileno e 3-(4'-metilbenzilideno)d-l-cânfora. Solúvel em água quando neutralizado. $\lambda_{\text{máx}}$ 334 nm (etanol)^(a,d).</p>
<p>Ecamsule (FQ)</p>	3,3'-(1,4-Fenilenodimetileno)bis-(ácido 7,7-dimetil-2-oxo-biciclo-(2,2,1)-1-heptilmetano sulfônico	Terephthalylidene dicamphor sulfonic acid (TDSA)	10,0 (expresso como ácido)	Ampla espectro UVA fotoestável e hidrossolúvel. $\lambda_{\text{máx}}$ 345 nm (água). Age na diminuição da pigmentação, formação de ácido <i>cis</i> -urocânico, hiperplasia epidérmica e no número de células de Langerhans (imunossupressão) ^(a,f) . Nome comercial: Mexoryl SX [®] .

Quadro 3 – Descrição dos tipos de filtros químicos e físicos, suas propriedades físico-químicas e a sua máxima concentração permitida segundo a legislação vigente (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2006) (*continuação*)

FQ – Amplo Espectro				
<p>Bemotrizinol (FQ)</p>	<p>(1,3,4)-Triazina-2,4-bis{[4-(2-etil-hexiloxi)-2-hidroxi]-fenil}-6-(4-metoxifenil) (Anisotriazine)</p>	<p>Bis-ethylhexyloxyphenol methoxyphenyl triazine (BEMT)</p>	<p>10,0</p>	<p>Absorvedor de amplo espectro UVA/UVB fotoestável e auxilia na estabilização de outros filtros como por exemplo, o 4-metoxicinamato de 2-etil-hexila e a avobenzona. Lipossolúvel e apresenta efeito sinérgico com outros absorvedores UV. $\lambda_{\text{máx}}$ 310 e 348 nm (etanol)^(a,d). Nome comercial: Tinosorb S®</p>
<p>Grupamento dos hidroxi-benzotriazole (FQ)</p>	<p>2-(2H-Benzotriazol-2-il)-4-metil-6-(2-metil-3-(1,3,3,3,-tetrametil-1-((trimetilsilil)oxi)-disiloxanil) propil}fenol (Silatriazole)</p>	<p>Drometrizole trisiloxane (DTS)</p>	<p>15,0</p>	<p>Absorvedor UVA/UVB e lipossolúvel. $\lambda_{\text{máx}}$ 303 nm (UVB) e 344 (UVA) em etanol. A molécula é formada por: (I) 12-hidroxifenilbenzotriazol (Fotoestável) absorve a radiação UVA e UVB e (II) cadeia siloxana – lipossolúvel^(a,d). Nome comercial: Mexoryl XL®</p>
<p>Bisotrizole (FQ)</p>	<p>2,2'-Metileno-bis-6-(2H-benzotriazol-2-il)-4-(tetrametil-butil)-1,1,3,3-fenol</p>	<p>Methylene-bis-benzotriazolyl tetramethylbutylphenol (MBBT)</p>	<p>10,0</p>	<p>Absorvedor UVB/UVA fotoestável, auxilia na estabilização de outros filtros fotoestáveis. Atua como filtro químico insolúvel e refletindo/refratando como filtro físico. Pó microfino, dispersado na fase aquosa das emulsões. $\lambda_{\text{máx}}$ 303 nm (UVB) e 358 (UVA) em água^(a,d). Nome comercial: Tinosorb M®</p>

Quadro 3 – Descrição dos tipos de filtros químicos e físicos, suas propriedades físico-químicas e a sua máxima concentração permitida segundo a legislação vigente (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2006) (**conclusão**)

Filtro Físico (FF)				
TiO ₂ (FF)	Dióxido de titânio	Titanium dioxide	25,0	Absorve em 308nm (UVB) e entre 320-340 nm (UVA), e age também, por espalhamento/reflexão dependendo do tamanho da partícula*. O tamanho da partícula entre 10-50 nm, apresenta efeito transparente, e a forma não micronizada pode chegar de 200-500 nm ^(e) . O índice de refração é de 2,6, isto significa que é um pigmento branco mais forte, e é mais difícil torná-lo transparente em produtos fotoprotetores ^(b,c,d,g) .
ZnO (FF)	Óxido de zinco	Zinc oxide	25,0	Fotoestável e associado com outros filtros químicos é mais eficaz. Absorção à radiação UVA I (acima de 380 nm), também por espalhamento/reflexão dependendo do tamanho da partícula*. Tamanho da partícula está entre 60-80 nm e apresenta efeito transparente, porém a forma não micronizada pode chegar de 200-500 nm ^(e) . Índice de refração é 1,9 (pigmento branco mais fraco), e é mais fácil torná-lo transparente em produtos fotoprotetores que o dióxido de titânio ^(b,c,d,g) .

Legenda: **FQ** – filtro solar químico ou orgânico; **FF** – filtro solar físico ou inorgânico; *quanto menor a partícula menor o espalhamento da luz uma propriedade dos filtros físicos.

INCI: International Nomenclature of Cosmetic Ingredients, conforme consta na EUROPEAN COMMISSION HEALTH AND CONSUMERS, 2009. **CMA %** - Concentração máxima autorizada segundo a legislação brasileira (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2006). **FDA** – *Food and Drug Administration* – órgão regulamentador de medicamentos e alimentos dos EUA (UNITED STATES, 1999).

Adaptação da literatura: (a) TUCHINDA *et al.*, 2006; (b) LEVY, 2001; (c) RAI; SRINIVAS, 2007; (d) LOWE, 2006; (e) ROELANDTS, 1998; (f) KULLAVANIJAYA; LIM, 2005; (g) ARAUJO; SOUZA, 2008.

O uso correto e orientado do fotoprotetor deve ser diário e reaplicado a cada 2 horas quando da exposição ao sol e/ou após atividade física intensa, banhos e sudorese intensa ou, pelo menos, no meio do dia, a fim de garantir fotoproteção abrangente. Do ponto de vista de desenvolvimento de formulações, produtos com valores de FPS acima de 30, muitas vezes utilizam concentração elevada de filtros químicos e físicos combinados, respeitando os limites estabelecidos pela legislação brasileira, fazendo com que as características sensoriais sejam comprometidas e também, podem propiciar o aparecimento de reações adversas como as fotoalérgicas e as fototóxicas (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2006; BARON *et al.*, 2008; FLOR, *et al.*, 2007; GASPARRO, 2000; LOWE, 2006; RAI; SRINIVAS, 2007).

Do ponto de vista do local de ação do produto, durante o desenvolvimento das formulações existe a preocupação em elaborar preparações cuja proteção oferecida para o usuário possui característica de amplo espectro (proteção contra as radiações UVA e UVB) (FLOR *et al.*, 2007). Busca-se, também, evitar ou minimizar as possíveis reações adversas ocasionadas pelo uso tópico destas formulações e pela penetração e permeação cutânea das substâncias ativas utilizadas, fato que possui potencial para ser reduzido quando da utilização de proporções diminuídas de filtros químicos e alcançar o FPS declarado do produto (RAI; SRINIVAS, 2007). Os filtros físicos utilizados em preparações de valor elevado de FPS (normalmente superior a 15) apresentam poucos relatos na literatura de incidência de efeitos adversos (ARAÚJO; SOUZA, 2008; BARON *et al.*, 2008; GONTIJO *et al.*, 2009).

A manutenção da estabilidade e eficácia de um produto fotoprotetor por um tempo prolongado é um grande desafio aos formuladores e de primordial importância no desenvolvimento das formulações. Considerando que a grande maioria dos fotoprotetores existentes estão veiculadas em formas cosméticas emulsionadas, em função de apresentarem as seguintes características, entre elas: (a) maior aceitabilidade pelo consumidor: aparência atrativa e agradáveis ao toque; (b) adaptabilidade às condições ambientais do Brasil; (c) facilidade de aplicação e de espalhabilidade; (d) maior estabilidade físico-química e microbiológica quando comparada com outras formas cosméticas e (e) permite a adição de ingredientes hidrossolúveis, lipossolúveis e insolúveis (FLOR *et al.*, 2007; MAIA CAMPOS, 2002; MILESI; GUTERRES, 2002; SCHUELLER; ROMANOWSKI, 2002).

Durante o desenvolvimento destes produtos, devem ser avaliados muitos dos fatores isolados ou associados que podem contribuir para torná-los instáveis antes do término do prazo de validade, entre eles (DIFFEY, 2001; FLOR *et al.*, 2007; MAIA CAMPOS, 2002; MILESI; GUTERRES, 2002; SCHUELLER; ROMANOWSKI, 2002):

✓ **fotoestabilidade** - por serem produtos destinados ao uso em locais de temperatura elevada e alta incidência de luz solar, os filtros solares presentes podem reagir com os raios UV, causando sua fotoxidação e fotodegradação comprometendo a capacidade fotoprotetora da formulação, além da indução da sensibilização e irritação da pele;

✓ **escolha de ingredientes** que promovam uma adequada espalhabilidade, formação de filme dando resistência à água, substantividade (emolientes e emulsionantes), homogeneidade, modificadores de sensorial (silicones). É interessante, também, a escolha de um veículo que promova a formação de uma película de revestimento com propriedade emoliente, hidratando a pele e sendo um obstáculo à penetração luminosa;

✓ o filtro solar contido no fotoprotetor deve permanecer retido na superfície da pele (estrato córneo) para ser efetivo, formando um filme e permeando o mínimo possível para a circulação sistêmica;

✓ **espessura e uniformidade do filme formado sobre a pele** (camada córnea): a quantidade e a camada de fotoprotetor aplicada varia muito de um indivíduo para outro, sendo demonstrado por meio de estudos que as pessoas utilizam entre 0,5 e 1,5 mg/cm², sendo que o preconizado para o teste de FPS é de 2 mg/cm². Com isto, o FPS alcançado é, normalmente, 20 a 50% menor que o esperado.

2.6 Novas substâncias fotoprotetoras de origem vegetal: os flavonoides

O desenvolvimento recente de formulações proporciona a possibilidade de associar a proteção da pele frente à radiação UV, utilizando também sequestradores de radicais livres e substâncias de ação antiinflamatória que, não somente, reduzam de forma significativa a reação eritematosa, mas que proporcionem diminuição da peroxidação lipídica da membrana celular e, conseqüentemente, minimização do envelhecimento precoce (MILESI; GUTERRES, 2002; WANG *et al.*, 2010).

As pesquisas de novas moléculas fotoestáveis para utilização em protetores solares ainda são extensivamente realizadas, sendo que, atualmente, se destaca o interesse crescente pelo desenvolvimento de filtros baseados em produtos naturais, com a capacidade de absorção da radiação UV pelos cromóforos da molécula, associada à possível atividade antioxidante (GUARATINI *et al.*, 2009). Existem algumas classes de substâncias com estas propriedades, que, são metabólitos secundários provenientes das plantas, como: as propiofenonas, os derivados do ácido cafeico, as lignanas, os tocotrienóis, os carotenóides e os flavonóides.

Estes ingredientes adicionados à formulação são conhecidos como de valores agregados ou multifuncionais (WANG *et al.*, 2010).

Os flavonoides são um grupo de substâncias antioxidantes hidrossolúveis e lipossolúveis. Eles ocorrem em seu estado livre (sem a presença da ligação com açúcares) ou em sua forma glicosídica, sendo denominados de aglicona e glicósidos, respectivamente (ACKER *et al.*, 1996; TREASE; EVANS, 1996; YAO *et al.*, 2004).

São derivados fenólicos e compreendem um grande grupo de compostos químicos caracterizados por um esqueleto de carbono C₆-C₃-C₆, onde C₆ são estruturas de anéis aromáticos, conforme apresentada na **Figura 6**. Estão amplamente distribuídos em, praticamente, todas as partes das plantas, particularmente em células fotossintéticas, e também presentes em bebidas como o chá, café, vinho tinto e a cerveja (BORS *et al.*, 1990; PATHAK *et al.*, 1991; SVOBODOVÁ *et al.*, 2003; YAO *et al.*, 2004).

A natureza química e as atividades bioquímicas dos flavonoides dependem de sua classe estrutural, grau de hidroxilação, outras substituições e conjugações, além do grau de polimerização. Os flavonoides podem ser subclassificados em chalconas, diidrochalconas, auronas, flavonas, flavanóis, diidroflavonóis, flavanóis, flavanona, antocianinas, isoflavonoides e biflavonoides (AMÍĆ *et al.*, 2003; BLOKHINA, *et al.*, 2003; SHAHIDI, 1997; TREASE; EVANS, 1996).

Figura 6. Precursores dos flavonoides e a representação do esqueleto de carbono C₆-C₃-C₆ (TREASE; EVANS, 1996)

Os flavonoides representados na **Figura 7**, como flavonoide reduzido (Fl— OH) e oxidado (Fl— O[•]) previnem a peroxidação lipídica por meio do “sequestro” de radicais de iniciação da peroxidação lipídica (Reação I e II da **Figura 7**), entre eles, (a) O₂^{•-}, OH[•], ¹O₂; (b) ligação a íons metálicos, podendo complexarem-se com íons de ferro e suprimirem a reação de Fenton (Reação III e IV da **Figura 7**); (c) aprisionamento de radicais peroxilas lipídicos; (d) inibição do sistema enzimático responsável pela produção de radicais livres, como: xantinoxidase, monooxidase, desidrogenase succinato mitocondrial, proteínas quinases e oxidase-NADH e (e) solubilidade e interação com as membranas (ACKER *et al.*, 1996; AFANAS’EV *et al.*, 1989; ARORA *et al.*, 1998).

Figura 7. Reação dos flavonoides como antioxidantes e antirradicais livres, e também a Reação de Fenton (AFANAS'EV *et al.*, 1989)

A estabilidade do radical livre flavanoil formado depende da deslocalização do elétron desemparelhado tendo a presença de hidroxilas em *orto*, apresentado na **Figura 8**; presença de duas insaturações no anel C e hidroxila em C-4' em B conjugada com a carbonila. A presença ou a ausência da hidroxila C-3 influencia o ângulo formado entre o radical e o anel B; conjugação da carbonila em C-4 com hidroxila em C-5. A doação do átomo de hidrogênio ocorre principalmente nas posições C-4' e C-7. Para a atividade de quelação de metais de transição é necessária a presença de grupos *orto*-difenólicos, como 3',4'-diidroxil, unidade catecol em B e/ou estruturas cetol como 4-ceto-3-hidroxi e 4-ceto-5-hidroxi. A dupla ligação 2,3 confere alta rigidez ao anel C mantendo uma posição mais coplanar relativa ao anel A e o grupo 3-OH por interagir com o anel B através de pontes de hidrogênio se posiciona no mesmo plano que os anéis A e C, que facilita inserção em membranas (AMIC' *et al.*, 2003; ARORA *et al.*, 1998).

Figura 8. Regiões estruturais dos flavonoides com uma alta atividade de sequestro de radicais livres (AMIC' *et al.*, 2003)

A alteração na estrutura molecular das cadeias laterais de flavonoides, sem alterar o núcleo antioxidante, muda a solubilidade e consequentemente promove mudanças na disponibilidade do composto antioxidante num determinado meio. Em consequência desta disponibilidade diferencial, a atividade antioxidante é alterada significativamente seja no

compartimento molecular ou no compartimento da formulação. Neste contexto a rutina e seu derivado hidrossolúvel, pertencentes à classe de flavonoides, serão incorporadas em emulsões fotoprotetoras e estudadas quanto a suas atividades antioxidantes e fotoprotetoras e possível estabilidade do sistema emulsionante (PEDRIALI, 2008).

Alguns exemplos de trabalhos científicos relacionados à atividade fotoquimioprotetora dos flavonoides estão relacionados abaixo:

O ácido cafeico (ácido 3,4-diidroxicinâmico) e o ácido ferúlico (ácido 4-hidroxi-3-metoxi-cinâmico) têm demonstrado que protegem os fosfolípidos de membrana da peroxidação lipídica (inibição dos radicais de iniciação e óxidos de nitrogênio) induzida pela radiação UV, além de proteger a pele humana do eritema induzido por UVB (SVOBODOVÁ *et al.*, 2003).

O resveratrol (*trans*-3,5,4'-triidroxiestilbeno) é um antioxidante com ação anti-inflamatória e inibe as substâncias iniciadoras de tumores associados aos processos celulares. Em um estudo realizado pelo grupo de pesquisa de Afaq *et al.* (2003) que envolveu aplicação tópica de resveratrol (25 µmol/0,2 mL em acetona) em ratos *hairless* SKH-1 e resultou em significativa diminuição de edema epidérmico induzido pela radiação UVB (180 mJ/cm²). A ação está associada a sua capacidade de impedir a chegada de leucócitos na epiderme e, consequentemente, a produção de peróxido de hidrogênio. Além disso, o resveratrol inibe a atividade enzimática da ornitina descarboxilase, enzima associada ao crescimento tumoral e sua expressão protéica, a peroxidação lipídica epidérmica induzida 24 horas após a exposição à radiação UV-B e, também, o efeito inflamatório por meio da inibição da atividade da ciclooxigenase reduzindo o estresse oxidativo local.

O estudo de Katiyar *et al.* (1997) foi feito com a silimarina, que é um extrato padronizado de flavonolignanas das sementes de *Silybum marianum* (L.), que aplicado topicamente (9 mg/200 µL), diariamente, por 14 dias em ratos fêmeas *hairless* SKH-1. Após isto, estes ratos foram irradiados com dose de UVB de 180 mJ/cm², e aplicou-se a solução tópica novamente. Foram avaliados diversos estágios da formação da carcinogênese, resultando em inibição de edema e queimadura induzidos por radiação UVB por depleção da atividade da catalase e ciclooxigenase associada à ornitina descarboxilase, proteção contra a formação de dímeros de ciclobutano-pirimidinas induzidos por UVB e diminuição da infiltração de leucócitos responsáveis pelo estresse oxidativo.

Os polifenóis presentes no chá verde, vermelho, preto e branco são conhecidos como epicatequinas e seus derivados e são provenientes da planta *Camelia sinensis*. Formulações tópicas com extratos e aquelas contendo polifenóis do chá verde foram aplicadas em ratos *hairless* e observados os resultados da proteção contra edema, eritema, peroxidação lipídica, formação de metabólitos da prostaglandina, carcinoma de células escamosas e basais da pele (KATIYAR *et al.*, 2001; WEI *et al.*, 1999). Um esquema de um possível mecanismo de supressão do sistema imunológico e gênese do tumor induzidos pela radiação UVB sugerido pelos autores está apresentado na **Figura 9**.

Figura 9. Esquema do possível mecanismo de supressão do sistema imunológico e gênese do tumor induzidos pela radiação UVB, por meio da aplicação tópica de polifenóis de chá verde. GTP (polifenóis do chá verde) e ROS (espécies reativas de oxigênio) (KATIYAR *et al.*, 2001)

A associação de extratos vegetais com as vitaminas ajudou a melhorar as condições da pele por efeitos sinérgicos, como a mistura de bioflavonoides do extrato de *Gingko biloba* com palmitato de retinol, acetato de tocoferol e tetraisopalmitato de ascorbila. Estes princípios ativos foram incorporados em formulações emulsionadas contendo 5% da associação flavonoides/vitaminas e aplicados topicamente ratos machos albinos e *hairless* (HRS/J-*hairless*) por 5 dias (5 mg/cm²). Após isto, foram expostos à radiação UVA/UVB (280-400 nm), por 9 min, com uma dose de radiação UVB de 21,6 J/cm². Comparando a área irradiada com a formulação controle e àquela que continha a associação dos bioflavonoides/vitaminas, observou-se que a última área apresentou diminuição no processo inflamatório, edema e vermelhidão. Além disso, por meio da atividade antioxidante desta mistura de bioflavonoides há uma manutenção da barreira epidérmica íntegra protegendo contra um desequilíbrio no manto hidrolipídico da pele e evitando a descamação (CAMPOS *et al.*, 2006).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Desenvolvimento, realização de estudos de estabilidade e seleção de sistemas cosméticos emulsionados de melhor desempenho para incorporação de rutina e seus derivados (succinato de rutina e succinato de metoxi-PEG-7-rutinila) associados ou não a filtros químicos e físico.

3.2 Específicos

- (a) Desenvolvimento de emulsões cosméticas incorporadas de substâncias antioxidantes constituídas por rutina a 0,1% p/p, succinato de rutina a 1% p/p e succinato de metoxi-PEG-7-rutinila a 1% p/p associadas ou não a filtros químicos (7,5% p/p de 4-metoxicinamato de 2-etilhexila e 3% p/p de 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona) e filtro físico (3% p/p de dióxido de titânio);
- (b) Realização da Avaliação Preliminar da Estabilidade (APE) e Testes de Estabilidade Acelerada (TEA) das emulsões cosméticas desenvolvidas e seleção daquelas de melhor desempenho por meio da análise dos parâmetros organolépticos (aspecto, cor e odor) e físico-químicos (medição de pH).

4 METODOLOGIA

4.1 Material

4.1.1 Princípio ativo (Grau de pureza farmacêutico)

- ✓ *Methoxy-PEG-7-rutiny succinate* (Biorusol II[®]SCA, Lote 002354): Galena, Brasil
- ✓ *Rutin* (Rutina, Lote 99220501, teor de pureza 98,8%): Natural Pharma, Brasil
- ✓ *Rutin succinate* (Succinato de rutina): obtido por síntese química, FCF/USP

4.1.2 Reagentes (Grau de pureza analítico)

- ✓ *Acrylates/C10-30 alkyl acrylate crosspolymer* (Pemulen[®]TR1, Lote 23589): Lubrizol, Estados Unidos

- ✓ *Acrylates/C10-30 alkyl acrylate crosspolymer* (Carbopol®Ultrez 20, Lote 325895555): Lubrizol, Estados Unidos
- ✓ *Ammonium acryloyldimethyl-taurate / VP copolymer (and) rapeseed oil sorbitol esters (and) trilaureth-4 phosphate (and) mineral oil (and) isopropyl palmitate* (Hostacerin®SAF, Lote BRAC041521042003): Clariant, Suíça
- ✓ *Benzophenone-3* (Uvinul®M 40, Lote AUTO065363): Daltomare Química, Brasil
- ✓ *Butylhydroxitoluene* (BHT, Lote 72000082001): Natural Pharma, Brasil
- ✓ *Caprylic/capric triglyceride* (Crodamol®GTCC, Lote L717954): Croda, Estados Unidos
- ✓ *Cetearyl alcohol (and) cetareth 20 (and) mineral oil (and) lanolin alcohol (and) petrolatum* (Crodabase®CR2, Lote 0000110553032007): Via Farma, Brasil
- ✓ *Cetearyl alcohol (and) dicetyl phosphate (and) ceteth-10 phosphate* (Crodafos®CES, Lote 0376142): Croda, Estados Unidos
- ✓ *Cetearyl alcohol (and) glyceryl stearate (and) PEG-2 stearate (and) stearic acid (and) ceteth-10 (and) polysorbate 60 (and) theobroma grandiflorum seed butter (and) helianthus annuus seed oil (and) cetyl palmitate* (Dermabase Vegetal®, Lote 0000337044): Croda, Estados Unidos
- ✓ *Cetearyl alcohol (and) polysorbate 60 (and) cetearyl glucoside (and) stearyl alcohol* (Uniox®C, Lote CHN 02960900): Chemyunion, Brasil
- ✓ *Cetearyl alcohol (and) sodium cetearyl sulfate* (Lanette®N, Lote 017/05122007): Natural Pharma, Brasil
- ✓ *Cetearyl alcohol (and) polyoxyethylene (20) sorbitan monostearate* (Polawax®NF, Lote 1787377): Croda, Estados Unidos
- ✓ *Citric acid* (Ácido cítrico, Lote 098768): Labsynth, Brasil
- ✓ *Cyclomethicone (and) dimethicone crosspolymer* (DC®9040, Lote 05H602082005): Dow Corning, Estados Unidos
- ✓ *Cyclopentasiloxane* (DC®245, Lote 00164803008112001): Dow Corning, Estados Unidos
- ✓ *Dimethicone (and) trimethylsiloxysilicate* (DC®593, Lote 0005370560): Dow Corning, Estados Unidos
- ✓ *Dissodium EDTA* (EDTA Na₂, Lote 20030220122006): Natural Pharma, Brasil
- ✓ *Essência para incorporação nas bases cosméticas Vanart®*: Givaudan, Estados Unidos

- ✓ *Ethylhexyl methoxycinnamate* (Uvinul[®] MC80, Lote 01/699122003): Daltomare Química, Brasil
- ✓ *Glyceryl stearate (and) behenyl alcohol (and) palmitic acid (and) stearic acid (and) lecithin (and) lauryl alcohol (and) myristyl alcohol (and) cetyl alcohol* (Prolipid[®], Lote 259832): ISP, Estados Unidos
- ✓ *Phenoxyethanol (and) methylparaben (and) butylparaben (and) ethylparaben (and) propylparaben (and) isobutylparaben* (Phenoben[®], Lote CH230696061997): Chemyunion, Brasil
- ✓ *Polyacrylamide and C13-14 isoparaffin and laureth-7* (Sepigel[®]305, Lote T53445): DEG, Brasil
- ✓ *Propylene glycol* (Lote M0792/10): Alpha Química, Brasil
- ✓ *Sorbitol* (Lote 43934): Labsynth, Brasil
- ✓ *Sodium polyacrylate (and) dimethicone (and) cyclopentasiloxane (and) trideceth-6 (and) PEG/PPG-18/18 dimethicone* (DC[®]2051, Lote A15/1293): Dow Corning, Estados Unidos
- ✓ *Titanium dioxide* (Eusolex[®]T, Lote 2385600002): Mapric, Brasil
- ✓ *Titanium dioxide (and) manganese oxide* (Optisol[®], Lote OX408): Croda, Estados Unidos
- ✓ *Titanium dioxide, manganese oxide, caprylic/capric triglyceride, tri-PPG-3 myristylether citrate, sorbitan isostearate and polyglyceryl-3-polyricinoleat* (Optisol[®]TD-50, Lote T040209): Croda, Estados Unidos
- ✓ *Triceteareth-4 phosphate (and) cetyl alcohol (and) stearyl alcohol (and) sodium cetearyl sulfate (and) oleth-10* (Hostacerin[®]CG, Lote BRAC067328) : Clariant, Suíça
- ✓ *Triethanolamine* (Lote 054681052009): Mapric, Brasil
- ✓ *Vinyl dimethicone crosspolymer (and) C12-14 pareth-12* (DC[®]9509, Lote 0001877150): Dow Corning, Estados Unidos
- ✓ *VP/eicosene copolymer* (Antaron[®]V220, Lote 01500141306): ISP, Estados Unidos

4.1.3 Equipamentos e acessórios

- ✓ Agitador magnético 713D: Fisatom[®], Brasil
- ✓ Balança analítica 205A SCS com precisão de 0,0001g: Precisa[®], Inglaterra
- ✓ Balança Semi-Analítica LC1: Marte[®], Brasil

- ✓ Balança Semi-Analítica BG4000[®]: Gehaka[®], Brasil
- ✓ Banho-maria termostatzado digital, com agitação e graduação de temperatura entre 0 a 80°C 500/3D[®]: Nova Ética[®], Brasil
- ✓ Banho Ultrassônico USC1600A[®]: Unique[®], Brasil
- ✓ Câmara Climática 420/CLD[®] 300, com graduação de temperatura de 20 à 60°C e de umidade relativa (UR) de 20 à 90%: Nova Ética[®], Brasil
- ✓ Centrífuga refrigerada CR20-B2: Hitachi[®], Japão
- ✓ Centrífuga RC5C[®] Sorvall: Dupont Instruments[®], Estados Unidos
- ✓ Chapa Aquecedora Redonda Plataforma Q310-22B[®]: Quimis[®], Brasil
- ✓ Espectrofotômetro TCC – 240A UV-Vis, com cubeta de quartzo com 1 cm de caminho óptico: Shimadzu[®], Japão
- ✓ Espectrofotômetro 50 UV-Vis Varian[®], com cubeta de quartzo com 1 cm de caminho óptico: Vankel[®], Austrália
- ✓ Estufa para secagem e esterilização MA033: Marconi[®], Brasil
- ✓ Freezer200[®] Slim: Cònsul[®], Brasil
- ✓ Homogeneizador/dispersor *Ultra Turrax* DI 25[®], com controle de velocidade variável entre 8.000 a 24.000 rpm: IKA[®], China
- ✓ Peagômetro Q400AS: Quimis[®], Brasil
- ✓ Pipeta 5-50 µL; 20-200 µL; 100-1000 µL: Eppendorf[®], Alemanha
- ✓ Pipeta High Precision Micropipette[®] 20-200 µL e 5-50 µL: Digipet[®], Estados Unidos
- ✓ Programa Statistica 7.0: StatSoft Inc[®]. South América, Estados Unidos
- ✓ Programa Cary Win UV 2.0: Simple Reads Application Software, Vankel[®], Austrália
- ✓ Programa BioEstat 5.0[®]: Wildlife Conservation Society, Estados Unidos
- ✓ Refrigerador Ecoplus 370: Bosch, Brasil

4.2 Métodos

4.2.1 Desenvolvimento e seleção das formulações fotoprotetoras

4.2.1.1 Formulações-testes fotoprotetoras: componentes e procedimento de preparo

As matérias-primas que foram utilizadas na elaboração dos sistemas fotoprotetores O/A estão relacionadas na **Tabela 1** acompanhadas de sua Nomenclatura Internacional dos Ingredientes Cosméticos (INCI), suas respectivas funções e concentrações usuais (EUROPEAN COMMISSION HEALTH AND CONSUMERS, 2009).

Numa **1ª Etapa do processo de desenvolvimento** das formulações, foram selecionadas 8 bases autoemulsionantes descritas quali- e quantitativamente na **Tabela 2** e numeradas de **I** a **VIII**. Cada formulação foi elaborada da seguinte forma: número sem letra – base cosmética sem adição de princípios ativos, (**A**) a base + rutina a 0,1% p/p, (**B**) a base + succinato de metoxi-PEG-7-rutinila a 1,0% p/p e (**C**) a base + succinato de rutina a 1,0% p/p. Ao final desta etapa foram preparadas 32 formulações-testes sob a seguinte técnica de preparação:

- ◆ Pesaram-se os componentes da fase aquosa (**Fase 1**) e aqueceu-se até a temperatura de 70,0-75,0°C;
- ◆ Quando os princípios ativos foram adicionados na **Fase 1** de acordo com as formulações (**A, B e C**) sob o mesmo aquecimento anterior, houve o acerto de pH para 8,0 com trietanolamina até a solubilização;
- ◆ Pesaram-se os componentes da fase oleosa (**Fase 2**) e aqueceu-se até a temperatura de 70,0-75,0°C, exceto para a formulação **VII** (Hostacerin[®]CG) a temperatura para o aquecimento foi de 85,0-90,0°C e a formulação **I** (Hostacerin[®]SAF) foi emulsionada a frio, misturando-a diretamente com a fase aquosa (**Fase 1**);
- ◆ Verteu-se a **Fase 2** em **1** sob forma lenta e constante em um béquer, com auxílio do agitador mecânico (800 rpm) até homogeneização da emulsão;
- ◆ Esperou-se a emulsão esfriar, sob agitação manual até a temperatura de 45,0-50,0°C e adicionou-se o conservante (**Fase 3**);
- ◆ Verificou-se o pH e, se necessário, foi ajustado para pH 6,0-6,5 (**Fase 4**).

As formulações (**I-VIII**) permaneceram 24 horas em repouso para finalização do processo de emulsificação (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004; PRISTA *et al.*, 1995; SCHUELLER; ROMANOWSKI, 2002) e início do estudo preliminar de estabilidade.

A partir das características visuais das amostras submetidas à Avaliação Preliminar da Estabilidade (APE) (**I a VIII** e/ou **A, B e C**), foram selecionadas duas bases autoemulsionantes de melhor desempenho (menor interação das substâncias bioativas com as bases estudadas) para a continuidade do trabalho de desenvolvimento. Iniciou-se assim a **2ª Etapa**, o processo de adição de ésteres emolientes, silicones, agentes quelantes, antioxidantes e polímeros hidrofílicos, associando-se às bases a rutina a 0,1% p/p, conforme a **Tabela 3**. Ao final desta etapa foram preparadas 14 formulações-testes (numeradas de **F1 a F14**) sob a seguinte técnica de preparação:

- ◆ Pesaram-se os componentes da fase aquosa (**Fase 1**) e aqueceu-se até a temperatura de 60,0-65,0°C. Quando a rotina foi adicionada a todas as formulações, houve o acerto de pH para 8,0 com trietanolamina até a solubilização;
- ◆ Na formulação **F1** foi adicionada a matéria-prima Pemulen® TR1, sendo necessária a agitação a 1000 rpm para sua dissolução;
- ◆ Pesaram-se os componentes da fase oleosa (**Fase 2**) e aqueceu-se até a temperatura de 60,0-65,0°C, exceto para as formulações **F1, F3, F4, F8, F9, F10, F11 e F14** (Hostacerin® SAF) foram emulsionadas a frio, misturando-as diretamente com a fase aquosa (**Fase 1**);
- ◆ Verteu-se a **Fase 2** em **1** sob forma lenta e constante em um béquer, com auxílio do agitador mecânico (800 rpm) até homogeneização da emulsão;
- ◆ Esperou-se a emulsão esfriar, sob agitação manual até a temperatura de 45,0-50,0°C. Houve a adição da mistura de silicones (**Fase 3**) com o auxílio do agitador mecânico (1500 rpm);
- ◆ Após a homogeneização da emulsão + silicones, adicionou-se a **Fase 4** (Sepigel® 305) com agitação mecânica (1500 rpm) para as formulações **F6, F7, F8, F9, F10, F11, F12 e F13**;
- ◆ Para as formulações **F1, F2, F3, F4 e F5** foi adicionada a quantidade de água (q.s.p.) + Carbopol® Ultrez 20 sob agitação mecânica (1500 rpm) previamente dissolvida sob aquecimento;
- ◆ A **Fase 5** foi previamente dispersada (filtros físicos + triglicerídeos do ácido cáprico/caprílico ou DC®593) nas proporções descritas na **Tabela 3** sob agitação mecânica a 1200 rpm;
- ◆ Após a homogeneização completa da emulsão, misturou-se o conservante (**Fase 6**);
- ◆ Verificou-se o pH e, se necessário, foi ajustado para pH 6,0-6,5 (**Fase 7**).

As formulações (**F1-F14**) permaneceram 24 horas em repouso para finalização do processo de emulsificação (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004; PRISTA *et al.*, 1995; SCHUELLER; ROMANOWSKI, 2002) e início do estudo preliminar de estabilidade.

Na **3ª Etapa do desenvolvimento**, as duas formulações completas selecionadas (uma contendo a base cosmética Hostacerin®SAF e a outra contendo Crodafos®CES) foram preparadas, adicionando-se ou não os princípios ativos e filtros solares, seguindo as seguintes combinações: (**F15**) sem princípios ativos e filtros solares, (**F16**) rotina a 0,1% p/p, (**F17**)

succinato de rutina a 1,0% p/p, **(F18)** succinato de metoxi-PEG-7-rutinila a 1,0% p/p, **(F19)** filtros solares e rutina a 0,1% p/p, **(F20)** filtros solares e succinato de rutina a 1,0% p/p, **(F21)** filtros solares e succinato de metoxi-PEG-7-rutinila a 1,0% p/p, **(F22)** filtros solares (**Tabela 4**). Os filtros solares utilizados foram: 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona (UVA) a 3,0% p/p, 4-metoxicinamato de 2-etilhexila (UVB) a 7,5% p/p e dióxido de titânio (filtro físico) a 3,0% p/p. Ao final desta etapa foram preparadas 16 formulações-testes, numeradas de **F15** a **F22** e subdivididas em **a** (Crodafos[®] CES a 5,0% p/p e Uniox[®] C a 3,0% p/p) e **b** (Hostacerin[®] SAF a 3,0% p/p) sob a seguinte técnica de preparação:

- ◆ Pesaram-se os componentes da fase aquosa (**Fase 1**) e aqueceu-se até a temperatura de 60,0-65,0°C. Quando a rutina ou a succinato de rutina ou a succinato de metoxi-PEG-7-rutinila foram adicionadas a algumas formulações, houve o acerto de pH para 8,0 com trietanolamina até a solubilização;
- ◆ Pesaram-se os componentes da fase oleosa (**Fase 2**) e aqueceu-se até a temperatura de 60,0-65,0°C, exceto para as formulações **F15b**, **F16b**, **F17b**, **F18b**, **F19b**, **F20b**, **F21b** e **F22b** (Hostacerin[®] SAF) foram emulsionadas a frio, misturando-as diretamente com a fase aquosa (**Fase 1**);
- ◆ Verteu-se a **Fase 2** em **1** sob forma lenta e constante em um béquer, com auxílio do agitador mecânico (800 rpm) até homogeneização da emulsão;
- ◆ Esperou-se a emulsão esfriar, sob agitação manual até a temperatura de 45,0-50,0°C. Houve a adição da mistura de silicones (**Fase 3**) com o auxílio do agitador mecânico (1500 rpm);
- ◆ Após a homogeneização da emulsão + silicones, adicionou-se a **Fase 4** (Sepigel[®] 305) com agitação mecânica (1500 rpm);
- ◆ A **Fase 5** foi previamente dispersada (dióxido de titânio + triglicerídeos do ácido cáprico/caprílico + DC[®] 593) sob agitação mecânica a 2000 rpm;
- ◆ Após a homogeneização completa da emulsão, misturou-se o conservante (**Fase 6**);
- ◆ Verificou-se o pH e, se necessário, foi ajustado para pH 6,0-6,5 (**Fase 7**) e houve a incorporação da essência Vanart[®] em todas as preparações.

As formulações (**F15-F22** subdivididas em **a** e **b**) permaneceram 24 horas em repouso para finalização do processo de emulsificação (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004; PRISTA *et al.*, 1995; SCHUELLER; ROMANOWSKI, 2002) e início do estudo preliminar de estabilidade.

Após o término das análises de estabilidade preliminar, iniciou-se a **4ª Etapa do Desenvolvimento** (preparação das formulações para o Teste da Estabilidade Acelerada): seleção das bases cosméticas Crodafo[®]CES + Uniox[®]C (**a**) e Hostacerin[®]SAF (**b**) com a definição do éster emoliente (triglicerídeos do ácido cáprico/caprílico), dos silicones (DC[®] 2051, DC[®]245, DC[®]9509, DC[®]593), do agente quelante (EDTA dissódico), do antioxidante (BHT), do agente umectante (propilenoglicol) e do conservante (mistura do fenoxietanol + parabenos), conforme a **Tabela 5**. As formulações-testes foram preparadas segundo as associações a seguir:

- **F23**: base sem princípios ativos e filtros solares;
- **F24**: base + base + 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona a 3,0% p/p + 4-metoxicinamato de 2-etilhexila a 7,5% p/p + dióxido de titânio a 3,0% p/p;
- **F25**: base + rutina a 0,1% p/p;
- **F26**: base + 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona a 3,0% p/p + 4-metoxicinamato de 2-etilhexila a 7,5% p/p + dióxido de titânio a 3,0% p/p + rutina a 0,1% p/p;
- **F27**: base + succinato de rutina a 1,0% p/p;
- **F28**: base + 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona a 3,0% p/p + 4-metoxicinamato de 2-etilhexila a 7,5% p/p + dióxido de titânio a 3,0% p/p + succinato de rutina a 1,0% p/p.

Ao final desta etapa foram preparadas 12 formulações-testes, numeradas de **F23** a **F28** e subdivididas em **a** (Crodafo[®]CES a 5,0% p/p e Uniox[®]C a 3,0% p/p) e **b** (Hostacerin[®] SAF a 3,0% p/p) sob a seguinte técnica de preparação:

- ◆ Pesaram-se os componentes da fase aquosa (**Fase 1**) e aqueceu-se até a temperatura de 60,0-65,0°C. Quando a rutina ou a succinato de rutina foram adicionadas a algumas formulações, houve o acerto de pH para 8,0 com trietanolamina até a solubilização;
- ◆ Pesaram-se os componentes da fase oleosa (**Fase 2**) e aqueceu-se até a temperatura de 60,0-65,0°C, exceto para as formulações **F23b**, **F24b**, **F25b**, **F26b**, **F27b** e **F28b** (Hostacerin[®] SAF) foram emulsionadas a frio, misturando-as diretamente com a fase aquosa (**Fase 1**);
- ◆ Verteu-se a **Fase 2** em **1** sob forma lenta e constante em um béquer, com auxílio do agitador mecânico (800 rpm) até homogeneização da emulsão;
- ◆ Esperou-se a emulsão esfriar, sob agitação manual até a temperatura de 45,0-50,0°C. Houve a adição da mistura de silicones (**Fase 3**) com o auxílio do agitador mecânico (1500 rpm);

- ◆ Após a homogeneização da emulsão + silicones, adicionou-se a **Fase 4** previamente dispersada (dióxido de titânio + triglicerídeos do ácido cáprico/caprílico + DC[®]593) sob agitação mecânica a 1500 rpm;
- ◆ Após a homogeneização completa da emulsão, misturou-se o conservante (**Fase 5**);
- ◆ Verificou-se o pH e, se necessário, foi ajustado para pH 6,0-6,5 (**Fase 6**) e houve a incorporação da essência Vanart[®] em todas as preparações.

As formulações (**F23-F28** subdivididas em **a** e **b**) permaneceram 24 horas em repouso para finalização do processo de emulsificação (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004; PRISTA *et al.*, 1995; SCHUELLER; ROMANOWSKI, 2002) e início do estudo de estabilidade acelerada.

Tabela 1 – Matérias-primas utilizadas na elaboração das formulações fotoprotetoras acompanhadas de suas nomenclaturas INCI, suas respectivas funções e suas concentrações usuais (continua)

Matérias-primas (Nome comercial ou nome comum)	INCI	Funções
Água destilada	<i>Aqua</i>	Veículo
Antaron [®] V220	<i>VP/eicosene copolymer</i>	Agente dispersante de suspensão e formador de filme doando resistência à água. Conc. Usual: 1,0-5,0% ⁽¹⁾
Biorusol II SCA [®]	<i>Methoxy-PEG-7-rutiny succinate</i>	Anti-irritante, antiedematoso e vasoprotetor. Conc. Usual: 0,5-1,0% ⁽²⁾
Butil-hidroxitoluol	<i>BHT</i>	Agente antioxidante da preparação. Conc. Usual: 0,03-0,1%
Carbopol [®] Ultrez 20	<i>Acrylates/C10-30 alkyl acrylate crosspolymer</i>	Polímero hidrofílico compatível com eletrólitos e formador de filme. Conc. Usual: 0,1-1,0% ⁽³⁾
Crodabase [®] CR2	<i>Cetearyl alcohol (and) cetareth-20 (and) mineral oil (and) lanolin alcohol (and) petrolatum</i>	Base autoemulsionante não-iônica com propriedades emolientes e umectantes para cremes e loções O/A. Conc. Usual: 18-25% ⁽⁴⁾
Crodafos [®] CES	<i>Cetearyl alcohol (and) dicetyl phosphate (and) ceteth-10 phosphate</i>	Cera autoemulsificante base fosfato O/A, auxiliando na espalhabilidade e conferindo sensorial agradável à pele. Apresenta comportamento tixotrópico e formador de filme doando resistência à água. Conc. Usual: 1,0-10,0% ⁽⁵⁾
Crodamol [®] GTCC	<i>Caprylic/capric triglyceride</i>	Emoliente, formador de filme não oclusivo sobre a superfície da pele. Alternativa para o óleo mineral e é compatível com silicones e ésteres sintéticos. Conc. Usual: 1,0-10,0% ⁽⁶⁾
DC [®] 2051	<i>Sodium polyacrylate (and) dimethicone (and) cyclopentasiloxane (and) trideceth-6 (and) PEG/PPG-18/18 dimethicone</i>	Modificador de sensorial (toque sensorial leve e sedoso), emoliente e espessante. Conc. Usual: 3,0-6,0% ⁽⁷⁾
DC [®] 245	<i>Cyclopentasiloxane</i>	Proporciona toque seco, sensação sedosa e é não gorduroso. Conc. Usual: 0,2-5,0% ⁽⁸⁾
DC [®] 593	<i>Dimethicone (and) trimethylsiloxysilicate</i>	Confere resistência a água (formador de filme), apresenta substantividade e toque seco à pele. Agente de dispersão de pigmentos. Conc. Usual: 0,2-5,0% ⁽⁹⁾
DC [®] 9509	<i>Vinyl dimethicone crosspolymer (and) C12-14 pareth-12</i>	Modificador de sensorial (proporciona toque seco e sedoso). Conc. Usual: 3,0-6,0% ⁽¹⁰⁾
DC [®] 9040	<i>Cyclomethicone (and) dimethicone crosspolymer</i>	Proporciona toque seco e sensação aveludada a pele, rápida absorção e não é gorduroso. Compatível com ciclometicona, dimeticona e feniltrimeticona. Conc. Usual: 3,0-6,0% ⁽¹¹⁾

Tabela 1 – Matérias-primas utilizadas na elaboração das formulações fotoprotetoras acompanhadas de suas nomenclaturas INCI, suas respectivas funções e suas concentrações usuais (**continuação**)

Dermabase Vegetal [®]	<i>Cetearyl alcohol (and) glyceryl stearate (and) PEG-2 stearate (and) stearic acid (and) ceteth-10 (and) polysorbate 60 (and) theobroma grandiflorum seed butter (and) helianthus annuus seed oil (and) cetyl palmitate</i>	Base autoemulsionante não-iônica O/A (associada a extratos vegetais) que promove hidratação e fácil espalhabilidade. É uma combinação de agentes espessantes, antioxidantes e emolientes. Conc. Usual: 5,0-18,0% ⁽¹²⁾
EDTA Na ₂	<i>Dissodium EDTA</i>	Agente quelante. Conc. Usual: 0,05-0,3%
Eusolex [®] T Dióxido de titânio micronizado	<i>Titanium dioxide</i>	Filtro solar físico. Conc. Máx: 25,0%
Hostacerin [®] CG	<i>Triceteareth-4 phosphate (and) cetyl alcohol (and) stearyl alcohol (and) sodium cetearyl sulfate (and) oleth-10</i>	Base autoemulsionante com característica aniônica O/A, apresentando rápida absorção, toque seco, fácil espalhabilidade. Contém éster fosfórico que promove afinidade da base com os fosfolipídeos da pele. Conc. Usual: 4,0-15,0% ⁽¹³⁾
Hostacerin [®] SAF	<i>Ammonium acryloyldimethyl-taurate / VP copolymer (and) rapeseed oil sorbitol esters (and) trilaureth-4 phosphate (and) mineral oil (and) isopropyl palmitate</i>	Base autoemulsionante com característica aniônica O/A, não pegajosa a pele e apresenta boa espalhabilidade. Tem a presença de emolientes e contém éster fosfórico que promove afinidade da base com os fosfolipídeos da pele. Conc. Usual: 3,0-10,0% ⁽¹⁴⁾
Lanette [®] N	<i>Cetearyl alcohol (and) sodium cetearyl sulfate</i>	Cera autoemulsionante aniônica O/A. Conc. Usual: 5,0-12,0% ⁽¹⁵⁾
Optisol [®]	<i>Titanium dioxide (and) manganese oxide</i>	Filtro solar físico. Conc. Usual: 1-10%
Optisol [®] TD-50	<i>Titanium dioxide, manganese oxide, caprylic/capric triglyceride, tri-PPG-3 myristylether citrate, sorbitan isostearate and polyglyceryl-3-polyricinoleat</i>	Dispersão de filtro solar físico. Conc. Usual: 1-15% ⁽¹⁶⁾
Pemulen [®] TR1	<i>Acrylates/C10-30 alkyl acrylate crosspolymer</i>	Polímero hidrofílico e formador de filme que promove resistência à água. Conc. Usual: 0,2-0,4% ⁽¹⁷⁾
Phenoben [®]	<i>Phenoxyethanol (and) methylparaben (and) butylparaben (and) ethylparaben (and) propylparaben (and) isobutylparaben</i>	Sistema conservante que atua em qualquer faixa de pH e é compatível com compostos não-iônicos, catiônicos e aniônicos. Conc. Usual: 0,4-0,7% ⁽¹⁸⁾
Polawax [®] NF	<i>Cetearyl alcohol (and) polyoxyethylene (20) sorbitan monostearate</i>	Cera autoemulsionante não-iônica para sistema O/A que promove hidratação à pele. É tolerante a eletrólitos agentes dispersantes. Conc. Usual: 2,0-25,0% ⁽¹⁹⁾
Prolipid [®]	<i>Glyceryl stearate (and) behenyl alcohol (and) palmitic acid (and) stearic acid (and) lecithin (and) lauryl alcohol (and) myristyl alcohol (and) cetyl alcohol</i>	Formador de gel lamelar com mistura de tensoativos anfífilos. É não pegajoso e formador de filme (resistência à água). Conc. Usual: 3,0-5,0% ⁽²⁰⁾
Propilenoglicol	<i>Propylene glycol</i>	Umectante para pele. Conc. Usual: 5,0-10,0%
Rutina	<i>Rutin</i>	Antioxidante e fotoprotetor da pele. Conc. Segura: 0,1%.

Tabela 1 – Matérias-primas utilizadas na elaboração das formulações fotoprotetoras acompanhadas de suas nomenclaturas INCI, suas respectivas funções e suas concentrações usuais (**conclusão**)

Sepigel®305	<i>Polyacrylamide and C13-14 isoparaffin (and) laureth-7</i>	Polímero emulsionante e espessante. Conc. Usual: 0,5-3,0%. ⁽²¹⁾
Sorbitol	<i>Sorbitol</i>	Umectante para pele. Conc. Usual: 1,0-8,0%.
Succinato de rutina	<i>Rutin succinate</i>	Antioxidante e fotoprotetor da pele. Conc. Segura: 0,1-0,4%.
Trietanolamina	<i>Triethanolamine</i>	Corretor de pH
Uniox®C	<i>Cetearyl alcohol (and) polysorbate 60 (and) cetearyl glucoside (and) stearyl alcohol</i>	Cera autoemulsionante de caráter não iônico. Conc. Usual: 5,0-15,0% / co-emulsionante: 2,0-5,0% ⁽²²⁾
Uvinul®M40	<i>Benzophenone-3</i>	Filtro solar químico UVA. Conc. Máx: 10,0%
Uvinul®MC80	<i>Ethylhexyl methoxycinnamate</i>	Filtro solar químico UVB. Conc. Máx: 10,0%

Legenda: *INCI* (International Nomenclature of Cosmetic Ingredient). Esta nomenclatura é encontrada em sistema digital da EUROPEAN COMMISSION HEALTH AND CONSUMERS, 2009, em: <http://ec.europa.eu/consumers/cosmetics/cosing/>. **Conc. Usual:** Concentração Usual. / **Conc. Máx:** Concentração Máxima. / **Conc. Segura:** Concentração Segura. / **O/A:** óleo em água. As concentrações usuais e respectivas funções de algumas matérias-primas foram pesquisadas diretamente na página da Internet de cada distribuidor como se segue: (1) MAPRIC, 2011; (2) PHARMACIA SAÚDE, 2011; (3) ADDIACTIVE, 2011; (4) SR BRASIL, 2011a; (5) SR BRASIL, 2011b; (6) SR BRASIL, 2011c; (7) DOW CORNING, 2011d; (8) MAPRIC, 2011b, (9) DOW CORNING, 2011a; (10) DOW CORNING, 2011c; (11) DOW CORNING, 2011b; (12) SR BRASIL, 2011d; (13) PHARMA SPECIAL, 2011a; (14) PHARMA SPECIAL, 2011b; (15) COGNIS, 2011; (16) CRODA DO BRASIL, 2011; (17) LUBRIZOL, 2011; (18) CHEIROS DA TERRA, 2011; (19) SR BRASIL, 2011e; (20) INNOVADEX, 2011; (21) CHEMYUNION, 2011; (22) DEG, 2011.

Tabela 2 – Descrição quali- e quantitativa das formulações autoemulsionantes cosméticas utilizadas na **1ª Etapa** do processo de desenvolvimento de formulações fotoprotetoras e suas associações com a rutina (**A**), com o succinato de metoxi-PEG-7-rutinila (**B**) e com o succinato de rutina (**C**)

FORMULAÇÕES								
Componentes	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Fase 1	% p/p							
Água destilada q.s.p.	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Fase 2								
Hostacerin® SAF (3-10%) ¹	8,0	-	-	-	-	-	-	-
Crodabase®CR2 (18-25%) ²	-	10,0	-	-	-	-	-	-
Crodafos®CES (1-10%) ³	-	-	7,0	-	-	-	-	-
Polawax®NF (2-25%) ⁴	-	-	-	10,0	-	-	-	-
Dermabase Vegetal® (5-18%) ⁵	-	-	-	-	18,0	-	-	-
Lanette®N (5-12%) ⁶	-	-	-	-	-	10,0	-	-
Hostacerin®CG (4-15%) ⁷	-	-	-	-	-	-	8,0	-
Uniox®C (5-15%) ⁸	-	-	-	-	-	-	-	15,0
Fase 3								
Phenoben®	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Fase 4								
Trietanolamina ou ácido cítrico a 20% q.s. pH	6,0-6,5	6,0-6,5	6,0-6,5	6,0-6,5	6,0-6,5	6,0-6,5	6,0-6,5	6,0-6,5

Legenda: número romano sem letra – base autoemulsionante cosmética sem adição de princípios ativos; (**A**) a base + rutina a 0,1% p/p; (**B**) a base + succinato de metoxi-PEG-7-rutinila a 1,0% p/p e (**C**) a base + succinato de rutina a 1,0% p/p. Os números dentro dos parênteses na frente dos nomes comerciais das bases autoemulsionantes são as concentrações mínima e máxima usuais, e foram pesquisadas diretamente na página da Internet de cada distribuidor como se segue: (1) PHARMA SPECIAL, 2011b; (2) SR BRASIL, 2011a; (3) SR BRASIL, 2011b; (4) SR BRASIL, 2011e; (5) SR BRASIL, 2011d; (6) COGNIS, 2011, (7) PHARMA SPECIAL, 2011a; (8) DEG, 2011.

Componentes	FORMULAÇÕES													
	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12	F13	F14
Fase 1														
	%													
	q.s.p.													
Água destilada	30,0	40,0	40,0	40,0		100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
EDTA Na ₂	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Pemulen®TR1	0,25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Propilenoglicol	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	3,0	3,0	5,0	5,0	5,0	5,0	3,0	3,0	5,0
Sorbitol	-	-	-	-	-	3,0	3,0	-	-	-	-	3,0	3,0	-
Rutina	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Fase 2														
BHT	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1
Antaron® V220	0,2	2,0	2,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Crodafos®CES	4,0	3,0	3,0	-	2,0	5,0	5,0	-	-	-	-	5,0	5,0	-
Uniox®C	-	-	-	-	-	3,0	3,0	-	-	-	-	-	-	-
Uvinul®M40	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	-	-	-	-	2,0	2,0	2,0
Prolipid®	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,0	3,0	-
Hostacerin® SAF	3,0	-	4,0	2,0	2,0	-	-	3,0	3,0	3,0	3,0	-	-	6,0
Fase 3														
DC®9509	-	-	-	-	-	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	-
DC®245	-	-	-	2,0	-	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	-
DC®9040	-	-	-	2,0	2,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DC®2051	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,0	-	-	-
Fase 4														
Carbopol® Ultrez 20	0,2	0,1	0,2	0,2	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Água destilada q.s.p.	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sepigel® 305	-	-	-	-	-	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	-
Fase 5														
Eusolex T®	2,0	2,0	2,0	1,0	1,0	1,0	-	1,0	-	1,0	-	1,0	-	2,0
Crodamol®GTCC	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	-	5,0	-	5,0	-	5,0	-	-
Uvinul®MC80	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0
DC 593®	-	-	-	3,0	-	3,0	-	3,0	-	3,0	-	3,0	-	-
Optisol®	-	-	-	-	-	-	-	-	2,0	-	2,0	-	-	-
Optisol® TD-50	-	-	-	-	-	-	2,0	-	-	-	-	-	2,0	-
Fase 6														
Phenoben®	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Fase 7														
Trietanolamina ou ácido cítrico a 20% q.s. pH	6,0 – 6,5													

Tabela 4 – Descrição quali- e quantitativa utilizadas no estudo de desenvolvimento (**3ª Etapa**) de formulações fotoprotetoras utilizando em **a** (Crodafos[®] CES e Uniox[®] C) e **b** (Hostacerin[®] SAF) incorporando a rutina, o succinato de rutina e o succinato de metoxi-PEG-7-rutinila

FORMULAÇÕES																
Componentes	F15		F16		F17		F18		F19		F20		F21		F22	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	A	b	a	B	a	b
Fase 1	%p/p															
Água destilada q.s.p.	100,0		100,0		100,0		100,0		100,0			100,0		100,0		100,0
EDTA Na ₂	0,2		0,2		0,2		0,2		0,2			0,2		0,2		0,2
Propilenoglicol	5,0		5,0		5,0		5,0		5,0			5,0		5,0		5,0
Rutina	-		0,1		-		-		0,1			-		-		-
Succinato de Rutina	-		-		1,0		-		-			1,0		-		-
Succinato de metoxi-PEG-7-rutinila	-		-		-		1,0		-			-		1,0		-
Fase 2																
BHT	0,2		0,2		0,2		0,2		0,2			0,2		0,2		0,2
Crodafos® CES	5,0	-	5,0	-	5,0	-	5,0	-	5,0	-	5,0	-	5,0	-	5,0	-
Uniox® C	3,0	-	3,0	-	3,0	-	3,0	-	3,0	-	3,0	-	3,0	-	3,0	-
Uvinul® M 40	-		-		-		-		3,0			3,0		3,0		3,0
Hostacerin® SAF	-	3,0	-	3,0	-	3,0	-	3,0	-	3,0	-	3,0	-	3,0	-	3,0
Fase 3																
DC®9509	1,0		1,0		1,0		1,0		1,0			1,0		1,0		1,0
DC®245	1,0		1,0		1,0		1,0		1,0			1,0		1,0		1,0
DC®2051	3,0		3,0		3,0		3,0		3,0			3,0		3,0		3,0
Fase 4																
Sepigel® 305	2,0		2,0		2,0		2,0		2,0			2,0		2,0		2,0
Fase 5																
Crodamol® GTCC	5,0		5,0		5,0		5,0		5,0			5,0		5,0		5,0
DC®593	3,0		3,0		3,0		3,0		3,0			3,0		3,0		3,0
Uvinul® MC80	-		-		-		-		7,5			7,5		7,5		7,5
Optisol®	-		-		-		-		3,0			3,0		3,0		3,0
Fase 6																
Phenoben®	0,5		0,5		0,5		0,5		0,5			0,5		0,5		0,5
Fase 7																
Trietanolamina ou ácido cítrico a 20% q.s. pH	6,0 – 6,5															
Essência Vanart® - Givaudan	0,2		0,2		0,2		0,2		0,2			0,2		0,2		0,2

Tabela 5 – Descrição quali- e quantitativa utilizadas no estudo de desenvolvimento (**4ª Etapa**) de formulações fotoprotetoras utilizando em **a** (Crodafos[®] CES e Uniox[®] C) e **b** (Hostacerin[®] SAF) incorporando a rutina e o succinato de rutina para o Teste de Estabilidade Acelerada (TEA)

Componentes	F23		F24		F25		F26		F27		F28	
	a	b	a	B	a	b	a	b	a	b	a	b
Fase 1	% p/p											
Água destilada q.s.p.	100,0		100,0		100,0		100,0		100,0		100,0	
EDTA Na ₂	0,2		0,2		0,2		0,2		0,2		0,2	
Propilenoglicol	3,0		3,0		3,0		3,0		3,0		3,0	
Rutina	-		-		0,1		0,1		-		-	
Succinato de Rutina	-		-		-		-		1,0		1,0	
Fase 2												
BHT	0,2		0,2		0,2		0,2		0,2		0,2	
Crodafos [®] CES	5,0	-	5,0	-	5,0	-	5,0	-	5,0	-	5,0	-
Uniox [®] C	3,0	-	3,0	-	3,0	-	3,0	-	3,0	-	3,0	-
2-hidroxi-4-metoxibenzofenona (UVA)	-		3,0		-		3,0		-		3,0	
4-metoxicinamato de 2-etilhexila (UVB)	-		7,5		-		7,5		-		7,5	
Hostacerin [®] SAF	-	3,0	-	3,0	-	3,0	-	3,0	-	3,0	-	3,0
Fase 3												
DC [®] 9509	1,0		1,0		1,0		1,0		1,0		1,0	
DC [®] 245	1,0		1,0		1,0		1,0		1,0		1,0	
DC [®] 2051	1,0		1,0		1,0		1,0		1,0		1,0	
Fase 4												
Triglicérides do ácido cáprico/caprílico	3,0		3,0		3,0		3,0		3,0		3,0	
DC [®] 593	2,0		2,0		2,0		2,0		2,0		2,0	
Dióxido de Titânio (Optisol[®] - filtro físico)	-		3,0		-		3,0		-		3,0	
Fase 5												
Phenoben [®]	0,5		0,5		0,5		0,5		0,5		0,5	
Fase 6												
Trietanolamina ou ácido cítrico a 20% q.s. pH	6,0-6,5		6,0-6,5		6,0-6,5		6,0-6,5		6,0-6,5		6,0-6,5	
Essência Vanart [®] - Givaudan	0,2		0,2		0,2		0,2		0,2		0,2	

4.2.2 Avaliação Preliminar da Estabilidade (APE)

As 74 formulações cosméticas foram submetidas à Avaliação Preliminar da Estabilidade (APE), após o período de repouso de 24 h do preparo, empregando os testes da centrifugação e estresse térmico. Este teste tem como o objetivo de auxiliar e orientar a escolha das formulações (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004).

4.2.2.1 Teste de centrifugação

O ensaio de centrifugação gera estresse na amostra resultando no aumento da força de gravidade (partículas se movem), com isto, fornece informações rápidas sobre sinais de instabilidade do sistema como: a precipitação, a separação de fases, a formação de sedimento compacto (*caking*) e coalescência (união de dois ou mais glóbulos que se aproximam formando um glóbulo maior na fase interna) (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2008; BABY *et al.*, 2004; LEONARDI; MAIA CAMPOS, 2001; QUACK *et al.*, 1976; RIBEIRO *et al.*, 1996).

Alíquotas das amostras foram pesadas e transferidas para tubos de centrífuga. O teste foi realizado em réplicas de dois empregando-se 5g de cada amostra em estudo, nas seguintes condições experimentais: temperatura ambiente ($22,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$); velocidade de rotação de 3000 rpm; tempo de teste de 30 minutos (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004; BABY *et al.*, 2004; LEONARDI; MAIA CAMPOS, 2001; RIBEIRO *et al.*, 1996).

4.2.2.2 Teste de estresse térmico

O teste envolvendo o banho termostatzado (estresse térmico) foi realizado sob condições controladas e com valores crescentes de temperatura, mantendo-se por determinado período de tempo até atingir o valor de 80°C , que devem ser compatíveis com a estabilidade dos componentes da formulação (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2008; BABY *et al.*, 2004; LEONARDI; MAIA CAMPOS, 2001; QUACK *et al.*, 1976; RIBEIRO *et al.*, 1996).

Alíquotas das formulações foram transferidas para tubos de ensaio. As amostras, em réplicas de dois empregando-se aproximadamente 5g de cada amostra, foram submetidas ao estresse térmico, em banho termostatzado, no intervalo de temperatura controlada entre $40,0 - 70,0^{\circ}\text{C}$, com progressão de elevação de $10,0^{\circ}\text{C}/30$ minutos. As formulações foram retiradas da condição drástica de estudo, ao término de $70,0^{\circ}\text{C}$, e avaliadas após atingirem a temperatura ambiente ($25,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$) (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004; BABY *et al.*, 2004; LEONARDI; MAIA CAMPOS, 2001; RIBEIRO *et al.*, 1996).

4.2.3 Teste de Estabilidade Acelerada (TEA)

As formulações selecionadas na APE foram preparadas em duplicata e submetidas ao Teste de Estabilidade Acelerada (TEA), após o período de repouso de 24 horas (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004). Foram pesados cerca de 15 g das formulações-testes e acondicionadas em um frasco de vidro transparente de boca larga, tampa do tipo rosca e batoque, adequadamente vedadas e capacidade de 20 g (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004).

As amostras armazenadas em temperatura ambiente ao abrigo da luz e umidade ($22,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$) foram consideradas como amostras padrão para este estudo (BABY *et al.*, 2004) e as análises foram realizadas a esta mesma temperatura ambiente. A seguir, estão descritas as condições adotadas e os dias pré-estabelecidos para as análises como se segue (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004; BABY *et al.*, 2004; RIBEIRO *et al.*, 1996):

- (a) - $10,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ (*freezer*) → durante 7 dias (análise no 7º dia);
- (b) $50,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ (estufa) → durante 7 dias (análises no 1º, 3º e 7º dias);
- (c) ciclos de $- 10,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}/24 \text{ h}$ (*freezer*) e $+ 45,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}/24 \text{ h}$ (estufa) → alternando-se os valores de temperaturas durante 12 dias (análises no 6º e 12º dias);
- (d) exposição à luz solar indireta, à temperatura ambiente ($25,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$) → durante 14 dias (análises no 3º, 7º e 14º dias);
- (e) $5,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ (refrigerador) → durante 14 dias (análises no 3º, 7º e 14º dias).

Nas condições de baixas temperaturas como em *freezer* ($- 10,0^{\circ}\text{C}$) e refrigerador ($5,0^{\circ}\text{C}$) podem provocar a separação de fase das emulsões, devido ao congelamento da fase aquosa ou mesmo acelerar a precipitação de ativos. Na estufa ($50,0^{\circ}\text{C}$) os processos físico-químicos e as velocidades de reação aumentam com a temperatura afetando sua viscosidade, solubilidade dos componentes e o coeficiente de partição entre as fases. A condição ciclo gela-degela (*freezer*-estufa) é um teste que alterna temperaturas elevadas com baixas temperaturas podendo produzir instabilidade mais rapidamente do que aqueles a uma temperatura constante. A temperatura ambiente ($25,0^{\circ}\text{C}$) retrata a condição mais provável de armazenamento do produto durante o período de comercialização (RIBEIRO *et al.*, 1996).

4.2.4 Parâmetros e critérios adotados nas avaliações de estabilidade

Os parâmetros a serem avaliados devem ser definidos pelo formulador e dependem das características do produto e dos ingredientes utilizados na formulação e envolvem as possíveis

alterações físicas e físico-químicas, como: aspecto, cor, odor e valor de pH. As análises foram realizadas à temperatura ambiente ($22,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$).

1ª Etapa do Desenvolvimento (32 formulações-testes) e **2ª Etapa do Desenvolvimento** (14 formulações-testes) → submetidas ao teste de centrifugação e foram avaliadas quanto aos parâmetros organolépticos;

3ª Etapa do Desenvolvimento (4 formulações-testes) → submetidas ao teste de centrifugação e foram avaliadas quanto aos parâmetros organolépticos e (12 formulações-testes) → além da avaliação anteriormente descrita também foram submetidas ao teste de estresse térmico e foram avaliadas quanto aos parâmetros físico-químicos (medição de pH).

Estas etapas de desenvolvimento foram necessárias com o intuito de selecionar a base autoemulsionante cosmética compatível com a associação ou não dos filtros químicos, físicos e moléculas modificadas de rotina, com relação à não apresentação de sinais de alteração e instabilidade. Como critérios adotados para a aprovação ou rejeição das amostras submetidas à Avaliação Preliminar da Estabilidade, apenas as formulações-teste classificadas como normal (**N**) para cada etapa do desenvolvimento, foram consideradas aptas para serem submetidas sequencialmente aos Testes de Estabilidade Acelerada.

4ª Etapa do Desenvolvimento (12 formulações-testes) → submetidas ao Teste de Estabilidade Acelerada durante 15 dias de estudo e foram avaliadas quanto aos parâmetros organolépticos e aos parâmetros físico-químicos (medição de pH) (BABY *et al.*, 2004; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004).

Esta etapa do desenvolvimento é orientativa e teve como objetivo a previsão da estabilidade das formulações-testes em condições drásticas de armazenamento (extremas de temperatura e luminosidade), e de curta duração (BABY *et al.*, 2004). Foram criteriosamente avaliadas após os ensaios, selecionando as de melhor desempenho que serão submetidas ao Teste de Estabilidade Normal. Os critérios adotados para a aprovação ou rejeição das amostras avaliadas (TEA) foram os seguintes (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004; BABY *et al.*, 2004):

→ **Aspecto:** integridade das amostras mantendo o aspecto inicial nas condições de armazenamento, classificada como **Normal (N)**, exceto em temperaturas elevadas, freezer ou ciclos em que leves modificações (**LM**) foram aceitas;

→ **Cor e odor:** normais (**N**) durante o armazenamento à luz solar indireta e direta à temperatura ambiente e leves modificações (**LM**) foram aceitas em temperaturas elevadas;

→ **Valor de pH:** a aceitação da variação foi de $\pm 5\%$, comparadas com o valor inicial em todas as condições de armazenamento. As formulações foram comparadas entre si empregando a

análise de variância dos valores de pH conforme mostrado a seguir: t_0 com t_3 ($22,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$; $5,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ e $45,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$); t_0 com t_7 ($22,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$; $5,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$; $45,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ e $-10,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$); t_0 com t_{14} ($22,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ e $5,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$); t_0 com t_6 e t_{12} (ciclo de $-10,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ e $45,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$).

4.2.4.1 Parâmetros organolépticos

A avaliação destes parâmetros ocorre por meio dos órgãos dos sentidos macroscopicamente – **avaliação visual** (aspecto e cor) e **olfativa** (odor), com o objetivo de verificar alterações como separação de fases, precipitação, homogeneidade, brilho e ausência ou presença de grumos possibilitando o reconhecimento primário do produto (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2008). Estas avaliações foram realizadas por meio de análises comparativas com uma formulação padrão armazenada em temperatura ambiente ao abrigo da luz e umidade ($22,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$) (BABY *et al.*, 2004).

A classificação foi feita da seguinte forma (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004; BABY *et al.*, 2004):

(M) modificada;

(LM) levemente modificada;

(N) normal, sem alteração quanto ao aspecto, cor e odor.

4.2.4.2 Parâmetros físico-químicos

São importantes para pesquisar alterações na estrutura da formulação que não podem ser detectadas visualmente e podem indicar problemas de estabilidade entre os ingredientes ou decorrentes do processo de fabricação (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004).

a) Determinação do pH das formulações

A determinação do pH é realizada pela diferença de potencial entre dois eletrodos (referência e medida) imersos na amostra a ser analisada, e a acidez ou alcalinidade da amostra resulta da atividade dos íons de hidrogênio na solução (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2008).

Houve a calibração do peagômetro com as soluções padrão (pH 7 e pH 4). Depois foram preparadas as dispersões a 10% p/v das formulações em réplicas de três, homogeneizadas e analisadas quanto ao valor de pH em água recém-destilada, à temperatura ambiente ($22,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$) (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2008; BABY *et al.*, 2004).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Desenvolvimento e seleção das formulações fotoprotetoras

As emulsões constituem o melhor veículo para os filtros solares. Sendo constituídas de componentes tanto apolares (lipossolúveis) quanto polares (hidrossolúveis), podem carregar em sua estrutura tanto filtros solares hidro e/ou lipossolúveis, recomendável, considerando o ponto de vista da proteção. As emulsões A/O são as mais adequadas para a proteção da pele, porém apresentam elevado caráter graxo ou gorduroso, com consequente desconforto para o usuário. Em razão ao exposto, as emulsões O/A constituem os sistemas mais empregados e garantem adequada proteção com características sensoriais mais adequadas ao usuário e, também, por ser um veículo apropriado para países de clima quente como o Brasil (FLOR *et al.*, 2007). Sendo assim, neste estudo foram selecionadas as bases autoemulsificantes (O/A), pois possibilitam a incorporação de filtros hidrossolúveis atuando em sinergismo com os filtros lipossolúveis.

Formulações fotoprotetoras, em especial as veiculadas em formas cosméticas emulsionadas, devem apresentar propriedades e atributos, como: espalhabilidade adequada, aparência atrativa, ausência do efeito de transferência do produto final para as peças de vestimenta, percepção sensorial agradável (não gorduroso, ressecante ou irritante à pele), facilidade de aplicação, características organolépticas adequadas, resistência à água e serem econômicas em relação ao custo (MAIA CAMPOS, 2002; MILESI; GUTERRES, 2002; SCHUELLER; ROMANOWSKI, 2002). Estas características são obtidas por meio da triagem criteriosa das matérias-primas e da tecnologia utilizada na produção das formulações de modo a assegurar a estabilidade físico-química e microbiológica, a segurança, a eficácia, a aceitação e a adesão do produto final pelo usuário.

Em concomitância com o desenvolvimento das formulações foram realizados os ensaios de estabilidade preliminar, principalmente o teste de centrifugação e por último o banho termostático, avaliando os parâmetros organolépticos e físico-químicos. Isto foi feito com o intuito de auxiliar na triagem das formulações aparentemente mais estáveis e rejeitar algumas que apresentavam sinais de instabilidade (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004).

Neste contexto, a escolha das bases auto-emulsificantes (total de 8) das formulações-teste referentes à **1ª Etapa do processo de desenvolvimento** foi relacionada às propriedades desejadas para a preparação fotoprotetora, entre elas:

→ sistema emulsionante O/A (fase externa aquosa) e com propriedades emolientes e hidratantes – maior aceitação por ter um sensorial agradável e não gorduroso;

→ 50% delas tem a característica não-iônica (Crodabase[®]CR2, Polawax[®]NF, Dermabase Vegetal[®] e Uniox[®]C) e 50% com característica aniônica (Hostacerin[®]SAF, Hostacerin[®]CG, Crodafos[®]CES e Lanette[®]N) – as formulações que contêm agentes emulsionantes não-iônicos apresentam maior resistência à variação de pH extremos e as aniônicas (três primeiras) possuem o grupamento fosfato, maior compatibilidade com a pele e menor grau de irritação (OSANAI *et al.*, 2010);

→ espalhabilidade facilitada e sensorial diferenciado como o toque seco (Dermabase Vegetal[®], Crodafos[®]CES, Hostacerin[®]SAF e Hostacerin[®]CG) – características essenciais para a melhora da eficácia do fotoprotetor associadas à formação de filme (MILESI; GUTERRES, 2002).

As características detalhadas de cada base autoemulsionante foram descritas na **Tabela 1** e as concentrações utilizadas no estudo de desenvolvimento para a incorporação da rutina, da succinato de rutina e da succinato de metoxi-PEG-7-rutinila foram relacionadas na **Tabela 2**.

Considerando os parâmetros organolépticos analisados após o teste de centrifugação e descritos detalhadamente na **Tabela 6**, os quais se referem aos dados das bases autoemulsionantes escolhidas para o início do estudo de desenvolvimento, as bases selecionadas foram a Crodafos[®]CES (**III**) e a Hostacerin[®]SAF (**I**), pois apresentaram a classificação quanto ao aspecto e à cor como **N** (normal) nas 3 incorporações realizadas com a rutina (**A**) e seus derivados succinatos (**B** e **C**). Portanto, as outras formulações preparadas (**II, IV, V, VI, VII e VIII**) e avaliadas pela APE, as quais apresentaram a presença de grumos, precipitados, elevada consistência, sem brilho, foram descartadas do estudo.

Tabela 6 – Avaliação das características organolépticas das formulações (**I** a **VIII**) isoladas (sem letra) e incorporadas com a rotina a 0,1% p/p (**A**), com o succinato de metoxi-PEG-7-rutinila a 1,0% p/p (**B**) e com o succinato de rutina a 1,0% p/p (**C**) (*continua*)

I	I(A)	I(B)	I(C)
Consistência elevada, com um brilho menos intenso que a base Crodafos® (III), toque não oleoso e coloração creme clara	Ausência de precipitados e apresentou melhor aderência à pele quando comparada à base I . Brilho na formulação e coloração amarela escura intensa	Sem presença de precipitados, boa espalhabilidade e aderência à pele semelhante a I(A) , brilho na formulação e coloração amarela com tom esverdeado	Sem presença de precipitados, boa espalhabilidade e aderência à pele semelhante a I(A) , brilho na formulação e coloração amarela com tom esverdeado mais escuro que a I(B)
Classificação do aspecto e cor: N	Classificação do aspecto e cor: N	Classificação do aspecto e cor: N	Classificação do aspecto e cor: N
II	II(A)	II(B)	II(C)
Consistência elevada e coloração branca	Consistência inferior que a formulação II , presença de pequenos grumos e coloração amarela intensa	Presença de pequenos grumos e coloração amarela não intensa	Consistência menor que a formulação II , presença de pequenos grumos, coloração amarela clara não intensa e separação de fases nesta formulação
Classificação do aspecto e cor: N	Classificação do aspecto e cor: M	Classificação do aspecto e cor: LM	Classificação do aspecto e cor: M
III	III(A)	III(B)	III(C)
Consistência elevada, ausência de grumos, boa espalhabilidade, toque macio e oleoso após sua aplicação na pele, brilho na preparação e coloração branca	Consistência elevada, com ausência de grumos e precipitados, boa espalhabilidade, brilho na formulação e coloração amarela com esverdeado	Consistência elevada, ausência de grumos e precipitados, boa espalhabilidade, brilho na formulação e coloração amarela escura não intensa	Consistência elevada, ausência de grumos e precipitados, boa espalhabilidade, brilho na formulação e coloração amarela clara
Classificação do aspecto e cor: N	Classificação do aspecto e cor: N	Classificação do aspecto e cor: N	Classificação do aspecto e cor: N
IV	IV (A)	IV (B)	IV (C)
Ausência de grumos, boa espalhabilidade, sem muito brilho na preparação e coloração branca	Presença de pequenos grumos e coloração amarela intensa	Formação de grumos esbranquiçados e coloração amarela mais escura intensa que a formulação IV (A)	Formação de grumos e coloração amarela clara
Classificação do aspecto e cor: N	Classificação do aspecto e cor: LM	Classificação do aspecto e cor: M	Classificação do aspecto e cor: M

Tabela 6 – Avaliação das características organolépticas das formulações (**I a VIII**) isoladas (sem letra) e incorporadas com a rotina a 0,1% p/p (**A**), com o succinato de metoxi-PEG-7-rutinila a 1,0% p/p (**B**) e com o succinato de rutina a 1,0% p/p (**C**) (**conclusão**)

V	V (A)	V (B)	V (C)
Ausência de grumos, boa espalhabilidade, alta consistência e coloração branca intensa	Formação de pequenos grumos, consistência elevada e coloração amarela intensa	Formação de pequenos grumos, consistência elevada e coloração amarela escura	Formação de grandes grumos, consistência baixa, e coloração branca amarelada
Classificação do aspecto e cor: N	Classificação do aspecto e cor: LM	Classificação do aspecto e cor: LM	Classificação do aspecto e cor: M
VI	VI (A)	VI (B)	VI (C)
Consistência elevada, com um brilho menos intenso que a base Crodafo [®] CES (III), ausência de grumos, média espalhabilidade, toque mais oleoso que as outras bases cosméticas e coloração branca intensa	Formação de alguns grumos, espalhabilidade inferior, consistência elevada e coloração amarela intensa	Formação de alguns grumos, espalhabilidade inferior, consistência elevada e coloração amarela menos intensa que a formulação VI (A)	Formação de muitos grumos, separação de fases, e coloração amarela menos intensa que a formulação VI (A)
Classificação do aspecto e cor: N	Classificação do aspecto e cor: M	Classificação do aspecto e cor: M	Classificação do aspecto e cor: M
VII	VII (A)	VII (B)	VII (C)
Ausência de grumos, boa espalhabilidade, alta consistência e coloração branca	Presença de grumos, espalhabilidade inferior e coloração amarela gema intensa	Presença de grumos, espalhabilidade inferior e coloração amarela escura intensa	Presença de grumos, espalhabilidade ruim e coloração amarela escura intensa
Classificação do aspecto e cor: N	Classificação do aspecto e cor: M	Classificação do aspecto e cor: M	Classificação do aspecto e cor: M
VIII	VIII (A)	VIII (B)	VIII (C)
Não formou uma emulsão com um aspecto aceitável, baixa espalhabilidade e coloração branca	Formação de grumos	Formação de grumos	Formação de grumos
Classificação do aspecto e cor: M	Classificação do aspecto e cor: M	Classificação do aspecto e cor: M	Classificação do aspecto e cor: M

Legenda: **M**- modificada; **LM** – levemente modificada; **N**- normal

Nesta pesquisa, os filtros solares químicos UVA (2-hidroxi-4-metoxibenzofenona), UVB (4-metoxicinamato de 2-etilhexila) e físico (dióxido de titânio) foram selecionados pelo seu amplo emprego em diversos fotoprotetores disponíveis no mercado e por apresentarem estudos científicos significativos quanto à eficácia frente à proteção contra as radiações UVA e UVB. Além disso, o uso do filtro físico é muito importante para interagir com a radiação UVA acima de 370 nm espalhando ou refletindo, região do espectro em que a 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona não tem sua ação efetiva (SCHUELLER; ROMANOWSKI, 2002; URBACH, 2001).

A escolha da incorporação da rutina a estes filtros solares numa mesma formulação foi realizada após alguns estudos preliminares da avaliação de sua atividade antioxidante e fotoprotetora associadas, pensando que a pele tem a concentração das substâncias antioxidantes endógenas diminuída quando em contato com a radiação UV. Além disso, o grupo de pesquisa de Cosmetologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP) realizou em 2007 algumas pesquisas prévias associando a rutina com os filtros químicos UVA e UVB mencionados acima e avaliou-se a eficácia fotoprotetora. Após a análise dos perfis de absorção das formulações verificou-se que a rutina a 0,1% p/p propiciou efeito sinérgico na elevação do valor do FPS de $7,34 \pm 0,24$ para $9,97 \pm 0,18$, na presença do 4-metoxicinamato de 2-etilhexila a 3,5% p/p e 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona a 1,0% p/p, representando aumento de 2,63 (VELASCO *et al.*, 2008). Com estes resultados apresentados, houve o interesse em trabalhar com a rutina e o succinato de rutina em sistemas emulsionados fotoprotetores com o intuito de melhorar a eficácia fotoprotetora e, também, a estabilidade dos filtros solares associados a elas em condições adversas de temperatura, umidade e luminosidade. Esta aplicação cosmética do derivado hidrossolúvel da rutina foi um aprofundamento do trabalho de pesquisa de Pedriali e colaboradores (2008).

Numa **2ª etapa do desenvolvimento**, o objetivo foi selecionar os componentes compatíveis (silicones, polímeros hidrofílicos, agentes conservante e quelante, ésteres emolientes, entre outros) que iriam ser incorporados às bases (Crodafos[®]CES e Hostacerin[®]SAF), aos filtros solares, à rutina e seus derivados, entre eles:

→ Adição do emoliente - triglicerídeos do ácido cáprico/caprílico: representante de cadeia média constituído por ésteres de ácidos caprílicos (C8) e cápricos (C10) derivados do óleo de coco, cadeia saturada, com estabilidade oxidativa, boa espalhabilidade, formação de filme não oclusivo e foi usado como diluente do filtro UVA (2-hidroxi-4-metoxibenzofenona) em pó e dispersante do dióxido de titânio, filtros físicos da formulação (DE NAVARRE, 1993);

→ Uso de polímeros emulsionantes e/ou espessantes (Sepigel®305, Pemulen®TR1 e Carbopol®Ultrez 20): são solúveis em água e conferem resistência ao enxágue após aplicação na pele por liberar a fase oleosa, podendo contribuir para a eficácia fotoprotetora da formulação. Em um estudo realizado no laboratório de Cosmetologia da FCF/USP a associação de 4-metoxicinamato de 2-etilhexila a 7,5% p/p, succinato de rutina a 1% p/p, Sepigel®305 em Crodafo®CES apresentou um aumento significativo do valor de FPS de $13,93 \pm 0,02$ (sem a presença de Sepigel®305) para $16,63 \pm 0,27$ (com a presença de Sepigel®305). Isto mostra que a escolha do veículo é muito importante, pois o efeito de espalhabilidade e de uniformidade do filme formado na pele pode influenciar o valor de FPS (eficácia fotoprotetora) (PEDRIALI *et al.*, 2011);

→ Escolha do Antaron®V220 (VP/eicosene copolymer): agente formador de filme que confere resistência à água;

→ Escolha dos silicones (DC®2051, DC®245, DC®9509, DC®9040 e DC®593) – apresentam-se como modificadores de sensorial (toque seco, aveludado, leve e sedoso), além de serem emolientes, espessantes e formadores de filme;

→ Escolha dos umectantes de classes diferentes para comparação quanto à sua atividade de retenção de água evitando a quebra da emulsão, como – classe dos glicóis (propilenoglicol) e dos polissacarídeos (sorbitol).

Com isto, optou primeiramente misturar as bases autoemulsionantes (Crodafo®CES e Hostacerin®SAF) com o polímero emulsionante (cruzado de acrilato/acrilato de alquila C10-30) e os filtros solares UVA, UVB, físico e a rutina (**F1**, **F2** e **F3**). O resultado da emulsão formada foi de instabilidade, apresentado uma aparência heterogênea, viscosidade baixa e separação de fases (**Tabela 7**). Mesmo adicionando silicones às misturas anteriores, o resultado de instabilidade permaneceu (**F3** e **F4** – **Tabela 7**).

A partir das formulações-teste **F6** até **F13** (**Tabela 7**) não houve a adição de Pemulen®TR1, Carbopol®Ultrez 20, Antaron®V220 e somente Sepigel®305 a 2,0% p/p. A associação do silicone DC®9040 com o DC®593 (**F4** – **Tabela 7**) propiciou a formação de grumos (incompatibilidade) e o primeiro foi trocado pelo DC®9509 com características semelhantes. A mistura de dois agentes umectantes (propilenoglicol e sorbitol) não foi adequada, pois gerou toque oleoso e espalhabilidade prejudicada (**F6**, **F7**, **F12** e **F13** – **Tabela 7**) e optou-se por utilizar apenas o propilenoglicol nas formulações seguintes.

Foram utilizados alguns tipos diferentes de dióxido de titânio: suspensão dispersada de coloração bege a 50% (**F7** e **F13** – **Tabela 7**), pó bege (**F9** e **F11** - **Tabela 7**) e em todas as outras formulações até a **F14** (**Tabela 7**) foi utilizado o pó branco. As formulações que continham o filtro físico dispersado a 50% (Optisol®T50) apresentaram problemas de formação de filme não uniforme

após a aplicação na pele, apresentando-se incompatível com o tipo de emulsão e seus componentes. Após um estudo das formulações de mercado existentes, percebeu-se que existe a tendência dos produtos fotoprotetores apresentarem a cor da formulação próxima daquela da pele do usuário. Então foi escolhido para a continuidade dos experimentos o dióxido de titânio na forma pó bege (compatível com os outros componentes da formulação), apesar deste somente ter sido usado na **F9** e **F11 (Tabela 7)**. A forma em pó foi dispersada com o auxílio do triglicérides do ácido cáprico/caprílico e do silicone DC[®]593 (responsável pela resistência ao enxágue). Estas matérias-primas (Optisol[®]T50 e Optisol[®]) usadas nestas formulações-teste apresentaram o dióxido de titânio modificado com o óxido de manganês, sendo este que conferiu a cor bege à formulação, mimetizando o tom de pele e evitando o efeito esbranquiçado característico de outras formulações similares.

Entre as 14 formulações (**F1 a F14 – Tabela 7**), as formulações-teste (**F6, F10 e F11 – Tabela 7**) foram as que tiveram os melhores resultados quanto às variáveis analisadas: toque macio, fácil espalhabilidade, ausência de grumos, formação de um filme com possível resistência a água e brilho. Neste momento, os ensaios foram realizados somente com a rotina associadas ao filtro UVB, UVA e físico.

Perante estes resultados, a próxima etapa do desenvolvimento (**3ª**) optou-se pelas duas bases autoemulsionantes **a** (Crodafos[®] CES a 5,0% p/p e Uniox[®]C a 3,0% p/p) e **b** (Hostacerin[®] SAF a 3,0% p/p) nos próximos ensaios realizados (**F15 a F22**) incorporando a rotina a 0,1% p/p (**F16**) e + a mistura de filtros solares (**F19**); a succinato de rutina a 1,0% p/p (**F17**) e + a mistura de filtros solares (**F20**) e a succinato de metoxi-PEG-7-rutinila a 1,0% p/p (**F18**) e + a mistura de filtros solares (**F21**). Sendo a base sem a adição de ativos e filtros solares a **F15** e a formulação com a mistura de filtros solares a **F22**. Todas as formulações descritas anteriormente foram da **Tabela 7**. Verificou-se após as análises dos parâmetros organolépticos que as formulações contendo a succinato de metoxi-PEG-7-rutinila apresentaram comprometimento da espalhabilidade e a presença de precipitados (sinais de instabilidade), com isto, este derivado da rutina foi rejeitado para a continuidade dos próximos ensaios.

Além disso, as outras formulações que apresentaram leves modificações (**F15A, F17A, F20A, F22A e F22B – Tabela 7**) foram em relação ao toque oleoso que poderia comprometer a estabilidade das futuras formulações, então optou-se na **4ª Etapa do Desenvolvimento** na diminuição da concentração de: silicones (DC[®]2051 de 3,0% para 1,0%, DC[®]593 de 3,0% para 2,0%); umectante (propilenoglicol de 5,0% para 3,0%) e éster emoliente (triglicerídeos do ácido cáprico/caprílico de 5,0% para 3,0%), conforme comparação da **Tabela 4** (3ª Etapa) e **5** (4ª Etapa). Nestas duas etapas do desenvolvimento foi adicionada também a essência Vanardi[®], fazendo com

que as formulações-teste estivessem completas para a Avaliação Preliminar da Estabilidade (triagem).

Nesta última etapa do desenvolvimento (4ª) a análise das formulações-teste (**F23** a **F28**, subdivididas em **a** e **b**) não foi somente a avaliação visual (parâmetros organolépticos) após o teste de centrifugação, mas também, a análise do valor de pH após as amostras serem submetidas ao Teste de Estresse Térmico (parâmetros físico-químicos) (**Tabela 8**).

Quanto ao teste de centrifugação (aspecto, cor e odor), nenhuma formulação apresentou modificações sendo classificadas como normal (**N**). Porém, quanto ao teste de estresse térmico (condição drástica de temperatura e umidade), as formulações **F23a**, **F24a**, **F24b** e **F28b** sofreram modificações mínimas em sua superfície principalmente ao que se refere ao escurecimento de sua cor inicial e foram classificadas como levemente modificadas (**LM**). A variação do valor de pH (% pH) de todas as formulações (**F23** a **F28**, subdivididas em **a** e **b** – **Tabela 8**) esteve entre 1,6-4,7%, portanto menor do que o critério de aceitação ($\pm 5\%$) determinado no início do desenvolvimento. Estas formulações-teste foram selecionadas para a avaliação posterior do Teste de Estabilidade Acelerada (TEA).

Tabela 7 – Análise dos parâmetros organolépticos (avaliação visual) das formulações fotoprotetoras desenvolvidas (F1 a F22) (continua)

Formulação	Observação visual
F1	Aspecto heterogêneo (pouca dispersão do dióxido de titânio), consistência elevada, cor levemente amarelada e espalhabilidade ruim. Classificação: M
F2	Formação de espuma, com aspecto de <i>mousse</i> e consistência reduzida. Classificação: M
F3	Consistência elevada com possível interação do Antaron® com o Hostacerin® SAF e formação de grumos. Classificação: M
F4	Consistência adequada, toque geleificado quando comparada com a formulação contendo Crodafo® CES e Uniox® C. Adição de silicones como: DC®245, DC®9040 e DC®593 e formação de grumos. Classificação: M
F5	Precipitação de rutina (pontos insolúveis amarelados). Interação entre as duas bases autoemulsificantes Crodafo® CES e Hostacerin® associada com o Carbopol Ultrez®20. Formaram-se grumos após a adição de DC®9040. Classificação: M
F6	Aspecto homogêneo, boa espalhabilidade e coloração amarelada. Não ocorreu formação de grumos após a adição do silicone DC® 9509 e DC® 245. Utilizou-se o Sepigel® como polímero hidrofílico. Classificação: N
F7	Diferenciou-se da anterior pela utilização do dióxido de titânio (Optisol® TD-50, mistura do filtro físico com ésteres emolientes e polímeros hidrofílicos). Coloração marrom avermelhada, toque seco mais intenso que a F6 , fácil espalhabilidade e, após a aplicação na pele, houve um descamamento da formulação. Classificação: LM
F8	Similar à F6 , com substituição da base autoemulsificante por Hostacerin®. Espalhabilidade adequada, coloração amarelada, mas a aparência não adequada. Classificação: LM
F9	Utilizou-se apenas o Optisol® sendo retirado o silicone DC® 593 e o éster emoliente Crodamol® GTCC. Apresentou boa espalhabilidade e coloração amarronzada. A adição do TWEEN 60 a 2% não melhorou a aparência e houve a precipitação do dióxido de titânio, deixando a aparência heterogênea. Classificação: M
F10	Formulação F8 , com adição do silicone DC®2051, melhorando a aparência. Coloração marrom clara. Classificação: N
F11	Formulação semelhante à F9 só que o silicone DC®2051 foi adicionado junto com o Optisol®. Coloração marrom claro avermelhada, boa espalhabilidade, brilho, houve um mascaramento do dióxido de titânio, não houve descascamento da formulação sobre a pele. Classificação: N
F12	Formulação semelhante à F6 , com adição do Prolipid® junto o Crodafo® CES. Coloração amarronzada. Toque oleoso e espalhabilidade comprometida. Classificação: M
F13	Similar a F12 , mas empregou a mistura Optisol® TD-50 (dióxido de titânio com ésteres emolientes e polímeros hidrofílicos). Coloração amarronzada avermelhada toque oleoso, difícil espalhabilidade, pontos brancos após aplicação na pele, brilho intenso e ausência de precipitado. Classificação: LM
F14	Concentração mais elevada de Hostacerin® a 6% que as demais formulações e sem a presença de silicones e polímeros hidrofílicos. Espalhabilidade comprometida, sem brilho na formulação, consistência elevada, efeito “tacking” após aplicação na pele e coloração bege amarelada. Classificação: M
F15A	Coloração branca, brilho, boa espalhabilidade, aspecto oleoso e consistência elevada. Classificação: LM
F15B	Coloração branca com tom levemente bege, brilho intenso maior que a anterior, boa espalhabilidade com sensação de hidratação (após aplicação) e sem descamamento após sua aplicação. Classificação: N
F16A	Formulação fotoprotetora com rutina na base de Crodafo® CES e Uniox® C. Coloração amarela clara, ausência de precipitados, aspecto oleoso e brilho, boa espalhabilidade e consistência maior que a base 15A . Classificação: N
F16B	Presença da rutina conferiu coloração amarela clara, brilho intenso, boa espalhabilidade, ausência de precipitado e aspecto não oleoso. Classificação: N
F17A	Presença da succinato de rutina na base de Crodafo® CES e Uniox® C promoveu coloração amarela clara, porém mais escura que a rutina. Brilho e fácil espalhabilidade. Classificação: LM

Tabela 7 – Análise dos parâmetros organolépticos (avaliação visual) das formulações fotoprotetoras desenvolvidas (**F1 a F22**) (**conclusão**)

F17B	Formulação com succinato de rutina na base de Hostacerin®SAF apresentou coloração amarela mais escura que aquela que continha a rutina, fácil espalhabilidade, ausência de precipitado e aspecto não oleoso. Classificação: N
F18A	Formulação com Biorusol II SCA® (<i>Methoxy-PEG-7-Rutiny Succinate</i>) na base de Crodafo®CES e Uniox®C coloração amarela mais escura que aquela com succinato de rutina. Presença de precipitados, média espalhabilidade (pior que das formulações anteriores) e maior consistência que a base cosmética (15A). Classificação: M
F18B	Formulação com Biorusol II SCA® (<i>Methoxy-PEG-7-Rutiny Succinate</i>) na base de Hostacerin®SAF apresentou coloração amarela bege, brilho, presença de precipitado e aspecto mais oleoso que as formulações 16B e 17B . Classificação: M
F19A	Formulação com rutina na base de Crodafo®CES e Uniox®C com os filtros químicos UVA e UVB e físico, coloração branca levemente amarelada, ausência de precipitado, fácil espalhabilidade, brilho e maior consistência que a base cosmética (15A). Classificação: N
F19B	Formulação com rutina na base Hostacerin®SAF associada com os filtros químicos UVA e UVB e físico, coloração amarela intensa, ausência de precipitado, fácil espalhabilidade, brilho e aspecto não oleoso. Classificação: N
F20A	Formulação com succinato de rutina na base de Crodafo®CES e Uniox®C com os filtros químicos UVA e UVB e físico, coloração amarela clara, brilho, aspecto oleoso, fácil espalhabilidade e consistência elevada que a base cosmética (15A). Classificação: LM
F20B	Formulação com succinato de rutina na base de Hostacerin®SAF com os filtros químicos UVA e UVB e físico, coloração amarela intensa, brilho, fácil espalhabilidade, ausência de precipitado e aspecto levemente oleoso. Classificação: N
F21A	Formulação com Biorusol II SCA® (<i>Methoxy-PEG-7-Rutiny Succinate</i>) na base de Crodafo®CES e Uniox®C com os filtros químicos UVA e UVB e físico, coloração amarela creme, presença de precipitado, brilho, aspecto oleoso, fácil espalhabilidade e consistência mais elevada que a base cosmética (15A). Classificação: M
F21B	Formulação com Biorusol II SCA® (<i>Methoxy-PEG-7-Rutiny Succinate</i>) na base de Hostacerin®SAF com os filtros químicos UVA e UVB e físico, coloração amarela muito escura, presença de precipitado, brilho, aspecto levemente oleoso e boa espalhabilidade. Classificação: M
F22A	Formulação com associação dos filtros químicos UVA e UVB e filtro físico na base de Crodafo®CES e Uniox®C, coloração branca, ausência de precipitados, presença de brilho, aspecto oleoso e consistência elevada que a base cosmética (15A). Classificação: LM
F22B	Formulação com associação dos filtros químicos UVA e UVB e físico na base de Hostacerin®SAF, coloração branca, boa espalhabilidade (não tanto quanto F19B , F20B e F21B), aspecto mais oleoso que F19B , F20B e F21B , brilho intenso e ausência de precipitado. Classificação: LM

Legenda: Classificação feita na frente de cada descrição da formulação foi em relação ao aspecto e à cor. / **M**- modificada; **LM** – levemente modificada; **N**- normal

Tabela 8 – Avaliação dos parâmetros organolépticos (aspecto, cor e odor) e físico-químico (valor de pH) das formulações-teste fotoprotetoras desenvolvidas na **4ª Etapa** após a Avaliação Preliminar de Estabilidade (APE) por meio dos testes de centrifugação e de estresse térmico

Formulações-teste	pH	Centrifugação	Estresse Térmico	pH*	% pH
(a)		Aspecto / cor / odor			
F23	6,5	N	LM	6,7	3,1
F24	6,6	N	LM	6,8	3,1
F25	6,4	N	N	6,6	3,1
F26	6,5	N	N	6,7	3,1
F27	6,4	N	N	6,7	4,6
F28	6,6	N	N	6,9	4,5
(b)		Aspecto / cor / odor			
F23	6,3	N	N	6,5	3,1
F24	6,4	N	LM	6,7	4,6
F25	6,2	N	N	6,3	1,6
F26	6,6	N	N	6,8	3,1
F27	6,4	N	N	6,7	4,7
F28	6,5	N	LM	6,7	3,1

Legenda: (a) Crodafo[®]CES a 5,0% p/p e Uniox[®]C a 3,0% p/p; (b) Hostacerin[®]SAF a 3,0% p/p; (F23) Base sem adição de princípios ativos; (F24) Base + filtros solares; (F25) Base + 0,1% p/p de rutina; (F26) Base + 0,1% p/p de rutina + filtros solares; (F27) Base + 1,0% p/p de succinato de rutina; (F28) Base + 1,0% p/p de succinato de rutina + filtros solares.

LM – levemente modificada; **N** - normal; **pH** – inicial antes de serem submetidas à Avaliação Preliminar de Estabilidade; **pH*** - valor de pH antes do Teste de Estresse Térmico.

Sendo:

Os filtros solares utilizados foram: 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona (UVA) a 3,0% p/p, 4-metoxicinamato de 2-etilhexila (UVB) a 7,5% p/p e dióxido de titânio (filtro físico) a 3,0% p/p. As formulações-teste foram preparadas em duplicata

Após a triagem das formulações-teste (F23 a F28, subdivididas em a e b) pela Avaliação Preliminar da Estabilidade foram submetidas também ao Teste de Estabilidade Acelerada (TEA), sob condições extremas de temperatura (durante 15 dias de análise) e permitiu fazer a seleção das formulações de melhor perfil quanto aos parâmetros organolépticos (aspecto, cor e odor) e físico-químicos (valor de pH).

O TEA foi um teste orientativo, indicando qual veículo cosmético ou formulações em estudo conferiram estabilidade adequada para ensaios futuros a este, como o Teste de Estabilidade Normal (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004).

Segundo os resultados da Tabela 9 e 10, a maioria das formulações apresentaram variações reduzidas no valor de pH, exceto nos 3 ° (F28a) e 7° (F23a e F24a) dias de análise na condição de estufa (45,0 ± 0,5°C) com valores percentuais excedentes de 6,3% para as 3 formulações. Uma outra condição onde excedeu o critério de aceitação (± 5%) foi no 12° dia dos ciclos (- 10,0/+ 45,0 ± 0,5°C), com valores percentuais excedentes de 6,3% para F26b e de 6,0% para F28b.

Tabela 9 – Avaliação dos parâmetros organolépticos (aspecto, cor e odor) e físico-químico (valor de pH) das formulações-teste fotoprotetoras desenvolvidas com a base cosmética Crodafos[®] CES (a) na 4ª Etapa durante o Teste de Estabilidade Acelerada (TEA) (continua)

F23a		Condições de Armazenamento											
		Luz solar 25,0 ± 2,0°C			Refrigerador 5,0 ± 0,5°C			Estufa 45,0 ± 0,5°C			Ciclos (24h) - 10,0/+ 45,0 ± 0,5°C		Freezer - 10,0 ± 0,5°C
		tempo (dias)											
Variáveis	T ₀	3	7	14	3	7	14	1	3	7	6	12	7
pH	6,3	6,3	6,3	6,3	6,3	6,3	6,3	6,3	6,5	6,7	6,3	6,3	6,3
% pH		-	-	-	-	-	-	-	3,1	6,3	-	-	-
Aspecto	Hom	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Cor	Branco	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Odor	CB	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
F24a													
pH	6,3	6,3	6,3	6,3	6,3	6,3	6,3	6,3	6,5	6,7	6,2	6,4	6,3
% pH		-	-	-	-	-	-	-	3,1	6,3	-1,6	1,6	-
Aspecto	Hom	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	LM ^a
Cor	Bege Escuro	N	N	N	N	N	N	N	LM ^b	LM ^b	N	N	N
Odor	CB	N	N	N	N	LM ^c	LM ^c	N	N	LM ^c	N	LM ^c	N
F25a													
pH	6,4	6,3	6,3	6,4	6,2	6,4	6,5	6,5	6,3	6,2	6,2	6,4	6,3
% pH		-1,6	-1,6	-	-3,2	-	1,6	1,6	-1,6	-3,2	-3,2	-	-1,6
Aspecto	Hom	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Cor	Amarelo Escuro	LM ^b	LM ^b	LM ^b	LM ^b	LM ^b	LM ^b	LM ^b	LM ^b	LM ^b	LM ^b	LM ^b	LM ^b
Odor	CB	N	N	N	N	LM ^c	LM ^c	N	N	LM ^c	N	LM ^c	LM ^c
F26a													
pH	6,4	6,4	6,4	6,4	6,4	6,3	6,2	6,6	6,5	6,3	6,4	6,5	6,4
% pH		-	-	-	-	-1,6	-3,2	3,1	1,6	-1,6	-	1,6	-
Aspecto	Hom	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Cor	Marrom Claro	N	N	N	N	LM ^b	LM ^b	N	N	N	LM ^b	LM ^b	LM ^b
Odor	CB	N	N	N	N	LM ^c	LM ^c	N	N	LM ^c	N	LM ^c	N

Tabela 9 – Avaliação dos parâmetros organolépticos (aspecto, cor e odor) e físico-químico (valor de pH) das formulações-teste fotoprotetoras desenvolvidas com a base cosmética Crodafo[®] CES (a) na **4ª Etapa** durante o Teste de Estabilidade Acelerada (TEA) (**conclusão**)

F27a													
pH	6,3	6,3	6,3	6,3	6,3	6,2	6,3	6,4	6,6	6,2	6,2	6,2	6,2
% pH		-	-	-	-	-1,6	-	1,6	4,8	-1,6	-1,6	-1,6	-1,6
Aspecto	Hom	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Cor	Amarelo Escuro Intenso	N	N	N	N	LM ^b	LM ^b	N	LM ^b	LM ^b	LM ^b	LM ^b	N
Odor	CB	N	N	N	N	LM ^c	LM ^c	N	LM ^c	LM ^c	N	LM ^c	N
F28a													
pH	6,3	6,3	6,3	6,3	6,4	6,3	6,2	6,5	6,7	6,4	6,4	6,2	6,3
% pH		-	-	-	1,6	-	-1,6	3,1	6,3	1,6	1,6	-1,6	-
Aspecto	Hom	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Cor	Marrom Claro menos Intenso	N	N	N	N	LM ^b	LM ^b	LM ^b	LM ^b	LM ^b	LM ^b	LM ^b	LM ^b
Odor	CB	N	N	N	N	LM ^c	LM ^c	N	LM ^c	LM ^c	N	LM ^c	LM ^c

Legenda: %pH: variação percentual do valor de pH em relação ao pH inicial; t₀: tempo inicial das leituras (24 horas após o preparo); **Hom**: aspecto homogêneo; N: normal; **LM**: levemente modificado; **LM^a**: modificação de aspecto quando espalhado sobre a placa de vidro; **LM^b**: coloração mais escura que a t₀; **LM^c**: odor menos intenso que a t₀;

M: modificada; **CB**: característico da base; (**F23**) Base sem adição de princípios ativos; (**F24**) Base + filtros solares; (**F25**) Base + 0,1% p/p de rutina; (**F26**) Base + 0,1% p/p de rutina + filtros solares; (**F27**) Base + 1,0% p/p de succinato de rutina; (**F28**) Base + 1,0% p/p de succinato de rutina + filtros solares

Sendo: filtros solares → 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona (UVA) a 3,0% p/p, 4-metoxicinamato de 2-etilhexila (UVB) a 7,5% p/p e dióxido de titânio (filtro físico) a 3,0% p/p. O valor de pH foi média de duas leituras

Tabela 10 – Avaliação dos parâmetros organolépticos (aspecto, cor e odor) e físico-químico (valor de pH) das formulações-teste fotoprotetoras desenvolvidas com a base cosmética Hostacerin[®] SAF (b) na **4ª Etapa** após o Teste de Estabilidade Acelerada (TEA) (continua)

F23b		Condições de Armazenamento											
		Luz solar 25,0 ± 2,0°C			Refrigerador 5,0 ± 0,5°C			Estufa 45,0 ± 0,5°C			Ciclos (24h) - 10,0/+ 45,0 ± 0,5°C		Freezer - 10,0 ± 0,5°C
		tempo (dias)											
Variáveis	t ₀	3	7	14	3	7	14	1	3	7	6	12	7
pH	6,3	6,3	6,3	6,3	6,3	6,2	6,2	6,3	6,2	6,2	6,4	6,5	6,2
% pH		-	-	-	-	-1,6	-1,6	-	-1,6	-1,6	1,6	3,1	-1,6
Aspecto	Hom	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Cor	Branco com tom de bege	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Odor	CB	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
F24b													
pH	6,4	6,4	6,4	6,4	6,4	6,3	6,2	6,4	6,4	6,3	6,3	6,2	6,4
% pH		-	-	-	-	-1,6	-1,6	-	-	-1,6	-1,6	-3,2	-
Aspecto	Hom	N	N	N	N	N	N	N	N	N	LM ^a	LM ^a	LM ^a
Cor	Bege Escuro	N	N	N	N	N	N	N	LM ^b	LM ^b	LM ^b	LM ^b	LM ^b
Odor	CB	N	N	N	N	N	N	N	N	LM ^c	LM ^c	LM ^c	N
F25b													
pH	6,4	6,4	6,4	6,4	6,4	6,2	6,1	6,4	6,3	6,1	6,7	6,5	6,4
% pH		-	-	-	-	-1,6	-4,7	-	-1,6	-4,7	4,7	1,6	-
Aspecto	Hom	N	N	N	M	M	M	N	N	N	N	N	N
Cor	Amarelo Escuro	N	N	LM ^b	LM ^b	LM ^b	LM ^b	N	N	N	LM ^b	LM ^b	N
Odor	CB	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
F26b													
pH	6,3	6,2	6,2	6,1	6,3	6,1	6,0	6,3	6,5	6,2	6,2	6,7	6,3
% pH		-1,6	-1,6	-3,2	-	-3,2	-4,8	-	3,2	-1,6	-1,6	6,3	-
Aspecto	Hom	N	LM ^a	LM ^a	N	N	N	N	N	LM ^a	LM ^a	LM ^a	LM ^a
Cor	Marrom Claro	N	N	N	N	N	N	N	N	N	LM ^b	LM ^b	LM ^b
Odor	CB	N	N	N	N	N	N	N	LM ^c	LM ^c	LM ^c	LM ^c	N

Tabela 10 – Avaliação dos parâmetros organolépticos (aspecto, cor e odor) e físico-químico (valor de pH) das formulações-teste fotoprotetoras desenvolvidas com a base cosmética Hostacerin® SAF (b) na **4ª Etapa** após o Teste de Estabilidade Acelerada (TEA) (**conclusão**)

F27b													
pH	6,4	6,4	6,5	6,5	6,4	6,4	6,5	6,4	6,3	6,5	6,5	6,0	6,4
% pH		-	1,6	1,6	-	-	1,6	-	-1,6	1,6	1,6	-6,3	-
Aspecto	Hom	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Cor	Amarelo Escuro Intenso	N	N	N	N	N	N	N	LM ^b	LM ^b	LM ^b	LM ^b	LM ^b
Odor	CB	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
F28b													
pH	6,4	6,4	6,3	6,5	6,3	6,5	6,4	6,4	6,3	6,1	6,2	6,7	6,4
% pH		-	-1,6	1,6	-1,6	1,6	-	-	-1,6	-3,2	-3,2	6,0	-
Aspecto	Hom	N	N	N	N	N	N	N	N	N	LM ^a	LM ^a	N
Cor	Marrom Claro Intenso	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Odor	CB	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

Legenda: **%pH:** variação percentual do valor de pH em relação ao pH inicial; **t₀:** tempo inicial das leituras (24 horas após o preparo); **Hom:** aspecto homogêneo; **N:** normal; **LM:** levemente modificado; **LM^a:** modificação de aspecto quando espalhado sobre a placa de vidro; **LM^b:** coloração mais escura que a t₀; **LM^c:** odor menos intenso que a t₀; **M:** modificada; **CB:** característico da base; **(F23)** Base sem adição de princípios ativos; **(F24)** Base + filtros solares; **(F25)** Base + 0,1% p/p de rutina; **(F26)** Base + 0,1% p/p de rutina + filtros solares; **(F27)** Base + 1,0% p/p de succinato de rutina; **(F28)** Base + 1,0% p/p de succinato de rutina + filtros solares

Sendo: filtros solares → 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona (UVA) a 3,0% p/p, 4-metoxicinamato de 2-etilhexila (UVB) a 7,5% p/p e dióxido de titânio (filtro físico) a 3,0% p/p. O valor de pH foi média de duas leituras

As formulações-teste (**F23** a **F28**) em ambas as bases **a** (Crodafo[®]CES a 5,0% p/p e Uniox[®]C a 3,0% p/p) e **b** (Hostacerin[®]SAF a 3,0% p/p) demonstraram-se com modificações leves (**LM**) numa maior frequência de aparecimento em todas as condições, exceto na condição de exposição à luz solar indireta ($25,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$), conforme **Tabela 9** e **10**. Estas modificações mínimas ocorridas foram quanto à apresentação de uma cor mais intensa que a t_0 (temperatura inicial) e de um odor menos intenso que a t_0 , entretanto quanto ao aspecto (espalhabilidade dificultada e ressecamento na superfície) nas seguintes formulações: **F24b** (base + filtros solares) nas condições de ciclos ($- 10,0/+ 45,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$) e freezer ($- 10,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$); **F26b** (Base + 0,1% p/p de rutina + filtros solares) em todas as condições exceto no refrigerador ($5,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$) e **F28b** (Base + 1,0% p/p de succinato de rutina + filtros solares) na condição de ciclos ($- 10,0/+ 45,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$). A formulação **F25b** (Base + 0,1% p/p de rutina), quanto ao aspecto sofreu, além das alterações descritas anteriormente, também a formação de grumos amarelados na condição de refrigerador ($5,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$), indicando que esta temperatura não seria a adequada para o armazenamento deste ativo. Estas alterações quanto ao aspecto ocorreram na base auto-emulsificante Hostacerin[®]SAF (**Tabela 10**).

Tais comportamentos eram esperados pelas condições drásticas de armazenamento, exceto para a formulação **F25b**, pois a temperatura apresenta relação direta com a aceleração da cinética de deterioração das formas cosméticas ou farmacêuticas e também precipitação de princípios ativos (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004; RIEGER, 1996).

Após o estudo de TEA, pode-se verificar que todas as formulações contendo succinato de rutina associada ou não aos filtros solares em ambas as bases estão aptas a continuar nos estudos posteriores, pois não apresentaram alterações organolépticas e de pH significativas durante as diferentes condições de armazenamento e tempos de análises.

As tabelas do estudo preliminar de estabilidade (**Tabela 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7**) foram diagramadas baseadas no trabalho de pesquisa de Chorilli, Udo, Cavallini, Leonardi (2006).

6 CONCLUSÕES

✓ Das 8 bases inicialmente testadas, foram selecionadas: Crodafo[®]CES (**a**) e Hostacerin[®]SAF (**b**), pois apresentaram a classificação quanto ao aspecto e à cor como N (Normal) nas 2 preparações com a rotina (**A**) e o succinato de rutina (**C**);

✓ No teste de centrifugação na avaliação de APE (aspecto, cor e odor), nenhuma das 12 formulações apresentou modificações, sendo classificadas como normal (**N**);

✓ No estresse térmico na avaliação de APE, as formulações **F23a**, **F24a**, **F24b** e **F28b** sofreram modificações mínimas em sua superfície, principalmente com leve escurecimento de sua cor inicial. Em relação à variação do valor de pH (% pH) as 12 formulações-teste estiveram dentro da faixa do critério de aceitação ($\pm 5\%$) entre 1,6-4,7%;

✓ As 12 formulações-teste apresentaram modificações mínimas em todas as condições da avaliação de TEA, exceto na exposição à luz solar indireta ($25,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$);

✓ Na análise do aspecto durante o Teste de Estabilidade Acelerada, ocorreram dificuldades na espalhabilidade e ressecamento na superfície nas seguintes formulações: **F24b** nas condições de ciclos e freezer; **F26b** em todas condições exceto no refrigerador e **F28b** na condição de ciclos. A formulação **F25b** apresentou também, formação de grumos amarelados na condição de refrigerador;

✓ De acordo com os resultados, as formulações contendo succinato de rutina (associada ou não aos filtros solares) testadas nas 2 bases selecionadas apresentaram-se promissoras para a continuidade dos estudos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS[†]

ACKER, S.A.B.E.; VAN DEN BERG, D.-J.; TROMP, M.N.J.L.; GRIFFIOEN, D.H.; VAN BENNEKOM, W.P.; VAN DER VIJGH, W.J.F.; BAST, A. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. **Free Radical Biology & Medicine**, v.20, n.3, p.331-342, 1996.

ADDIACTIVE. Carbopol Ultrez 20. Disponível em: <http://www.addiactive.com/Portals/0/pdf/catalogue/CarbopolUltrez20.pdf>. Acesso em: 8 jun. 2011.

AFANAS'EV, I.B.; DOROZHKO, A.I.; BRODSKII, A.V.; KOSTYUK, V.A.; POTAPOVITCH, A.I. Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. **Biochemical Pharmacology**, v.38, n.11, p.1763-1769, 1989.

AFAQ, F.; AHMAD, V.M.; AHMAD, M. Prevention of short-term ultraviolet B radiation-mediated damages by resveratrol in SKH-1 hairless mice. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.186, n.1, p.28-37, 2003.

AFAQ, F.; ADHAMI, V.M.; MUKHTAR, H. Photochemoprevention of ultraviolet B signaling and photocarcinogenesis. **Mutation Research**, v.571, n.1-2, p.153-173, 2005. [Review].

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Legislação. **Resolução RDC n.237, de 22 de agosto de 2002**. Regulamento técnico sobre protetores solares em cosméticos. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2002/237_02rdc.pdf. Acesso em: 27 mar. 2009.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Guia de estabilidade de produtos cosméticos**. Brasília: ANVISA, 2004. v.1, 47p. (Séries temáticas da ANVISA: Qualidade em cosméticos, 1).

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução RDC n.47, de 16 de março de 2006**. Regulamento técnico determina a publicação da "Lista de filtros ultravioletas permitidos para produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes". Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=21264&word>. Acesso em: 27 mar. 2009.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Guia de controle de qualidade de produtos cosméticos**. 2.ed. Brasília: ANVISA, 2008. 121p.

ALLEN, J.P.; BICKERS, D.R.; MOY, R.L. Actinic keratoses. **Journal American Academy of Dermatology**, v. 36, n. 4, p. 650-653, 1997.

AMIĆ, D.; DAVINDOVIĆ-AMIĆ, D.D.; BESLO, D.; TRINAJSTIĆ, N. Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. **Croatica Chemica Acta**, v.76, n.1, p.55-61, 2003.

[†] As referências bibliográficas estão de acordo com a norma NBR6023/2002 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

ARAUJO, T.S.; SOUZA, S.O. Protetores solares e os efeitos da radiação ultravioleta. **Scientia Plena**, v.4, n.11, p.1-7, 2008.

ARORA, A.; NAIR, M.G.; STRASBURG, G.M. Structure-activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system. **Free Radicals in Biology and Medicine**, v.24, n.9, p.1355-1363, 1998.

ARUOMA, O.I. Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, v.32, n.7, p.671-683, 1994. [Review].

BABY, A.R.; MACIEL, C.P.M.; ZAGUE, V.; KANEKO, T.M.; CONSIGLIERI, V.O.; VELASCO, M.V.R. Estabilidade de produtos de aplicação tópica: ensaios aplicados aos produtos cosméticos e dermatológicos emulsionados. **International Journal of Pharmaceutical Compounding (Edição Brasileira)**, v.6, n.3, p.130-139, 2004.

BARBER, A.D.; HARRIS, S.R. Oxygen free radicals and oxidants: a review. **American Pharmaceutical**, v.34, n.1, p.26-35, 1994. [Review].

BARON, E.D.; KIRKLAND, E.B.; DOMINGO, D.S. Advances in photoprotection. **Dermatology Nursing**, v.20, n.4, p.265-273, 2008.

BLOKHINA, O.; VIROLAINEN, E.; FAGERSTEDT, K.V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. **Annals of Botany**, v.91, n.2, p.179-194, 2003. [Review].

BORS, W.; HELLER, W.; MICHEL, C.; SARAN, M. Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. **Methods in Enzymology**, v.186, p.343-355, 1990.

CAMPOS, P.M.B.G.M.; GIANETI, M.D.; KANASHIRO, A.; LUCISANO-VALIM, Y.M.; GASPAR, L. R. *In vitro* antioxidant and *in vivo* photoprotective effects of an association of bioflavonoids with liposoluble vitamins. **Photochemistry and Photobiology**, v.82, p.683-688, 2006.

CHEIROS DA TERRA. **Phenonip**. Disponível em: <http://www.cheirosdaterra.hd1.com.br/arquivos/phenonip.pdf>. Acesso em: 19 jun. 2011.

CHEMYUNION. **Sepigel 305**. Disponível em: <http://www.chemyunion.com.br/site/html/produtos/produto.aspx?Pais=17&Lang=1&M=Produtos&D=1500&F=10&S=5050&Prod=5024&Hair=0&Skin=0>. Acesso em: 19 jun. 2011.

CHORILLI, M.; UDO, M.S.; CAVALLINI, M.E.; LEONARDI, G.R. Desenvolvimento e estudos preliminares de estabilidade de formulações fotoprotetoras contendo Granlux GAI-45 TS®. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 27, n.3, p. 237-246, 2006.

CRODA DO BRASIL. **Optisol TD 50**. Disponível em: <http://www.croda.com/home.aspx?view=dtl&d=content&s=147&r=273&p=1859&prodID=686>. Acesso em: 20 jun. 2011.

COGNIS. Care Chemicals. **Lanette N**. Disponível em: [http://www.products.cognis.com/cognis/prodleaf.nsf/\(\\$ProductsbyDocID_PL-Header\)/REF7C6174FD583B76EE41256B7A00445603/\\$file/LANETTE_r_N_E.pdf](http://www.products.cognis.com/cognis/prodleaf.nsf/($ProductsbyDocID_PL-Header)/REF7C6174FD583B76EE41256B7A00445603/$file/LANETTE_r_N_E.pdf). Acesso em: 20 jun. 2011.

DEG. **Uniox C**. Disponível em: http://www.deg.com.br/pdf/literatura_pdf.php?cod=320. Acesso em: 20 jun. 2011.

DE FABO, E.C.; NOONAN, F.P.; FEARS, T.; MERLINO, G. Ultraviolet B but not ultraviolet A radiation initiates melanoma. **Cancer Research**, v. 64, n. 18, p. 6372-6376, 2004.

DE NAVARRE, M.G. Emollient creams. In: _____. **The chemistry and manufacture of cosmetics**. 2.ed. Orlando: Continental Press, 1993. v.3, cap.18, p.265-281.

DIFFEY, B. L. Solar ultraviolet radiation effects on biological systems. **Review in Physics in Medicine and Biology**, v.36, n.3, p.299-328, 1991.

DOW CORNING. **DC 593**. Disponível em: <http://www.dowcorning.com/applications/search/products/details.aspx?prod=01225707&type=PROD>. Acesso em: 12 jun. 2011a.

DOW CORNING. **Dow Corning® 9040 Silicone Elastomer Blend: a guide**. Disponível em: <http://www.dowcorning.com/content/publishedlit/27-1130-01.pdf?DCWS=Beauty%20and%20Personal%20Care&DCWSS>. Acesso em: 12 jun. 2011b.

DOW CORNING. **Dow Corning® 9509 Silicone Elastomer Suspension**. Silicone. Disponível em: <http://www1.dowcorning.com/DataFiles/090007c880227d23.pdf>. Acesso em: 12 jun. 2011c.

DOW CORNING. **Dow Corning RM 2051 Thickening Agent**. Disponível em: <http://www.dowcorning.com/content/publishedlit/27-1183-01.pdf>. Acesso em: 12 jun. 2011d.

EUROPEAN COMMISSION HEALTH AND CONSUMERS. **Cosmetics Ingredients & Substances – CosIng**. Simple or Advanced Search. Disponível em: <http://ec.europa.eu/consumers/cosmetics/cosing/>. Acesso em: 18 dez. 2009.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.43, n.1, p.61-68, 1997.

FITZPATRIC, T.B.; PATHAK, M.; PARRISH, J.A. Protection of human skin against the effects of the sunburn ultraviolet (290-320nm). In: _____. **Sunlight and man, normal and abnormal photobiological responses**. Tokio: University of Tokio Press, 1974. p. 751.

FITZPATRICK, T.B.; FREEDBERG, I.M. EISEN, A.Z.; WOLFFK, A.K.F.; GOLDSMITH, L.A. **Tratado de Dermatologia**. 5.ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2005. v.1, p.823-872, 1080-1116, 1555-1561.

FLOR, J.; DAVOLOS, M.R.; CORRÊA, M.A. Protetores solares. **Química Nova**, v.30, n.1, p.153-158, 2007.

GASPARRO, F.P. Sunscreens, skin, photobiology, and skin cancer: the need for UVA protection and evaluation of efficiency. **Environmental Health Perspectives**, v.108, supl.1, p.71-78, 2000.

GONTIJO, G.T.; PUGLIESI, M.C.C.; ARAÚJO, F.M. Fotoproteção. **Surgical & Cosmetic Dermatology**, v.1, n.4, p.186-192, 2009.

GREITER, F.; GSCHNAIT, F. Effect of UV light on humans. **Photochemistry and Photobiology**, v.39, n.1, p.869-873, 2008.

GUARATINI, T.; CALEJON, D.R.; PIRES, D.C.; LOPES, J.N.C; LIMA, L.M.; NETO, D.G.; SUSTOVICH, C.; LOPES, N.P. Fotoprotetores derivados de produtos naturais: perspectivas de mercado e interações entre o setor produtivo e centros de pesquisa. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 717-721, 2009.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: a personal view. **Nutrition Reviews**, v.52, n.8, p.253-265, 1994.

HÖNIGSMANN, H. Erythema and pigmentation. **Photodermatology Photoimmunology & Photomedicine**, v. 18, n.2, p.75-81, 2002.

INCA. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Estatísticas do Câncer. Incidência. **Estimativa 2010: Incidência de Câncer no Brasil**. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/estimativa20091201.pdf>. Acesso em: 26 jun 2011.

INNOVADEX. Prolipid 141. Disponível em: <http://www.innovadex.com/PersonalCare/Detail/159/32041/PROLIPID-141>. Acesso em: 19 jun. 2011.

JENKINS, G. Molecular mechanisms of skin ageing. **Mechanisms of Ageing and Development**, v.123, n.7, p.801-810, 2002.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Pele e anexos. In: _____. **Histologia básica**. 10.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p.301-310.

KATIIYAR, S.K.; KORMAN, N.J.; MUKHTAR, H.; AGARWAL, R. Protective effects of silymarin against photocarcinogenesis in a mouse skin model. **Journal of the National Cancer Institute**, v.89, n.8, p.556-566, 1997.

KATIIYAR, S.K.; BERGAMO, B.M.; VYALIL, P.K.; ELMETS, C.A. Green tea polyphenols: DNA photodamage and photoimmunology. **Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.65, n.2-3, p.109-114, 2001.

KRICKER, A.; ARMSTRONG, B.K.; ENGLISH, D.R.; HEENAN, P.J. Does Intermittent sun exposure cause basal cell carcinoma? A case-control study in Western Australia. **International Journal of Cancer**, v.60, n. 4, p. 489-494, 1995.

KULLAVANIJAYA, P.; LIM, H.W. Photoprotection. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v.52, n.6, p.937-958, 2005.

LAUTENSCHLAGER, S.; WULF, H. C.; PITTELKOW, M.R. Photoprotection. **Lancet**, v.370, n.9586, p.528-537, 2007.

LEONARDI, G.R.; MAIA CAMPOS, P.M.B.G. Estabilidade de formulações cosméticas. **International Journal of Pharmaceutical Compounding (Edição Brasileira)**, v.3, n.4, p.154-156, 2001.

LEVY, S.B. UV Filters. In: BAREL, A.O.; PAYE, M.; MAIBACH, H.I. **Handbook of Cosmetic Science and Technology**. 2.ed. New York: Marcel Dekker, 2001. p.451-463.

LOWE, N.J. An overview of ultraviolet radiation, sunscreens, and photo-induced dermatoses. **Dermatologic Clinics**, v.24, n.1, p.9-17, 2006.

LUBRIZOL. Markets. Personal Care. Products. Personal Care Products. **Pemulen™ Polymeric Emulsifiers. Pemulen™ TR-1 Polymeric Emulsifiers**. Disponível em: <http://www.lubrizol.com/PersonalCare/Products/Pemulen/default.html>. Acesso em: 19 jun. 2011.

MAPRIC. Produtos. **Antaron V220**. Disponível em: http://www.mapric.com.br/anexos/boletim35_23082007_093249.pdf. Acesso em: 8 jun. 2011a.

MAPRIC. **Silicone DC 245**. Disponível em: http://www.mapric.com.br/anexos/boletim530_14112007_085325.pdf. Acesso em: 12 jun. 2011b.

McLOONE, P.; SIMICS, E.; BARTON, A.; NORVAL, M.; GIBBS, N.K. An action spectrum for the production of *cis*-urocanic in human skin *in vivo*. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 124, p. 1071-1074, 2005.

MAIA CAMPOS, P.M.B.M. Desenvolvimento de produtos cosméticos. **Cosmetics & Toiletries**, v.14, n.5, p.66-69, 2002.

MARROT, L.; MEUNIER, J.R. Skin DNA photodamage and its biological consequences. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v.58, n.5, supl.2, p.S139-148, 2008.

MATSUMURA, Y.; ANANTHASWAMY, H.N. Molecular mechanisms of photocarcinogenesis. **Frontiers in Bioscience**, v.7, p.D765-D783, 2002.

MILESI, S.S.; GUTERRES, S.S. Fatores determinantes da eficácia de fotoprotetores. **Caderno de Farmácia**, v.18, n.2, p.81-87, 2002.

NOONAN, F.O.; DE FABO, E.C. Immunosuppression by ultraviolet B radiation: initiation by urocanic acid. **Immunology Today**, v. 13, n.7, p.250-254, 1992.

OSANAI, S.; YAMADA, G.; HIDANO, R.; BEPPU, K.; NAMIWA, K. Preparation and properties of phosphate surfactants containing ether and hydroxy groups. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 13, n.1, p. 41-49, 2010.

PATHAK, D.; PATHAK, K.; SINGLA, A.K. Flavonoids as medicinal agents: recent advances. **Fitoterapia**, v.57, n.5, p.371-389, 1991.

PEDRIALI, C.A.; UCHOA, A.F.; BERNUSSO, L.C.; POLAKIEWICZ, B. The synthesis of a water-soluble derivative of rutin as an antiradical agent. **Química Nova**, v.31, n.8, p.2147-2151, 2008.

PEDRIALI, C.A.; IIZUKA, S.S.; BALOGH, T.S.; PINTO, C.A.S.O.; KANEKO, T.M.; BABY, A.R.; VELASCO, M.V.R. In vitro sun protection factor evaluation of sunscreens containing rutin and its derivative. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 30, n.5, p. 1021-1024, 2011.

PHARMACIA SAÚDE. **Biorusol II SCA**. Disponível em: http://www.pharmacia.saude.com.br/site/mp_ver.asp?id=153. Acesso em: 19 jun. 2011.

PHARMA SPECIAL. **Hostacerin CG**. Disponível em: http://www.pharmaspecial.com.br/imagens/literaturas/Lit_HOSTACERIN_CG.pdf. Acesso em: 8 jun. 2011a.

PHARMA SPECIAL. **Hostacerin SAF**. Disponível em: http://www.pharmaspecial.com.br/imagens/literaturas/Lit_HOSTACERIN_SAF.pdf. Acesso em: 8 jun. 2011b.

PRISTA, L.N.; ALVES, A.C.; MORGADO, R. **Tecnologia Farmacêutica**. 5.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1995. p.597-668.

QUACK, J.M.; RENG, A.K.; SKRYPZAK, W. Testing stability of cosmetics emulsions. **Cosmetics & Toiletries**, v. 91, n. 10, p. 21-38, 1976.

QUIROGA, R. M. Anti-aging medicine as it relates to dermatology. In: BURGESS, C.M. **Cosmetic Dermatology**. Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2005. p.2-14.

RAI, R.; SRINIVAS, C.R. Photoprotection. **Indian Journal of Dermatology Venereology Leprology**, v.73, n.2, p.73-79, 2007.

RIBEIRO, A.M.; KHURI, E.; GOTTARDI, D. Validação de testes de estabilidade para produtos cosméticos. In: Anais do 10º Encontro Brasileiro de Químicos Cosméticos. São Paulo, 1996; p. 349 – 375.

RIEGER, M.M. Teste de estabilidade para macroemulsões. **Cosmetics & Toiletries**, v.8, n.5, p.47-53, 1996.

ROELANDTS, R. Shedding light on sunscreens. **Clinical and Experimental Dermatology**, v.23, n.4, p.147-157, 1998.

SCHUELLER, R.; ROMANOWSKI, P. **Iniciação à Química Cosmética**. São Paulo: Tecnopress, 2002. v.1, p.23-29.

SHAHIDI, F. Natural antioxidants: an overview. In: _____. **Natural antioxidants: chemistry, health effects and applications**. Champaign: AOCS Press, 1997. p.1-11.

SIMIS, T.; SIMIS, D.R.C. Doenças da pele relacionadas à radiação solar. **Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba**, v.8, n.1, p.1-8, 2006.

SPRINGSTEEN, A.; YUREK, R.; FRAZIER, M.; CARR, K.F. *In vitro* measurement of sun protection factor of sunscreens by diffuse transmittance. **Analytica Chimica Acta**, v.380, n.2-3, p.155-164, 1999.

SR BRASIL. Croda. **Crodabase CR2**. Disponível em: <http://srbrasil.com/croda.html>. Acesso em: 8 jun. 2011a.

SR BRASIL. Croda. **Crodafos CES**. Disponível em: <http://srbrasil.com/croda.html>. Acesso em: 8 jun. 2011b.

SR BRASIL. Croda. **Crodamol GTCC – TRIGL. AC. CÁPRICO CAPRÍLICO**. Disponível em: <http://srbrasil.com/croda.html>. Acesso em: 7 jun. 2011c.

SR BRASIL. Croda. **Dermabase vegetal**. Disponível em: <http://srbrasil.com/croda.html>. Acesso em: 8 jun. 2011d.

SR BRASIL. Croda. **Polawax NF**. Disponível em: <http://srbrasil.com/croda.html>. Acesso em: 8 jun. 2011e.

SVOBODOVÁ, A.; PSOTOVÁ, J.; WALTEROVÁ, D. Natural phenolics in the prevention of UV-induced skin damage. A review. **Biomedical Papers**, v.147, n.2, p.137-145, 2003.

TAYLOR, S.C. Photoaging and pigmentary changes of the skin. In: BURGESS, C.M. **Cosmetic Dermatology**. Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2005. p.29-49.

TORNALETTI, S.; PFEIFER, G.P. UV damage and repair mechanisms in mammalian cells. **BioEssays**, v.18, n.3, p.221-228, 1996.

TREASE, G.E.; EVANS, W.C. Phenols and phenolic glycosides. In: _____. **Pharmacognosy**. 14.ed. London: W.B. Saunders, 1996. p.218-254.

TUCHINDA, C.; LIM, H.W.; OSTERWLADER, U.; ROUGIER, A. Novel emerging sunscreen technologies. **Dermatologic Clinics**, v.24, n.1, p.105-117, 2006.

UNITED STATES. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Sunscreen drug products for over-the-counter human use. Final Monograph. **Federal Register**, n.64, n.98, p.27666-27693, 1999 (Final Rule). Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/DevelopmentResources/Over-the-CounterOTCDrugs/StatusofOTCRulemakings/ucm090244.pdf>. Acesso em: 14 jan. 2009.

URBACH, F. The historical aspects of sunscreens. **Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.64, n.2-3, p.99-104, 2001.

VELASCO, M.V.R.; BALOGH, T.S.; PEDRIALI, C.A.; SARRUF, F.D.; PINTO, C.A.S.O.; KANEKO, T.M.; BABY, A.R. Associação da rotina com p-metoxicinamato de octila e benzofenona-3: avaliação *in vitro* da eficácia fotoprotetora por espectrofotometria de refletância. **Latin American Journal of Pharmacy**, v.27, n.1, p.23-27, 2008.

WANG, S.Q.; BALAGULA, Y.; OSTERWALDER, U. Photoprotection: a review of the current and future technologies. **Dermatologic Therapy**, v. 23, p. 31-47, 2010.

WEI, H.; ZHANG, X.; ZHAO, J.F.; WANG, Z.Y.; BICKERS, D.R.; LEBWOHL, M. Scavenging of hydrogen peroxide and inhibition of ultra-violet light-induced oxidative DNA damage by aqueous extracts from green and black teas. **Free Radicals in Biology and Medicine**, v.26, n.11-12, p.1427-1435, 1999.

WIECHERS, J.W. Optimizing skin delivery of active ingredients from emulsions. In: ROSEN, M.R., ed. **Delivery system handbook for personal care and cosmetic products: technology, applications, and formulations**. Noewich: William Andrew Publishing, 2005. p.409-436. (Breakthroughs in personal care and cosmetic technology).

WLASCHEK, M.; TANTCHEVA-POÓR, I.; NADERI, L.; MA, W.; SCHNEIDER, A.; RAZI-WOLF, Z.; SCHÜLLER, J.; SCHARFFETTER-KOCHANKEK, K. Solar UV irradiation and dermal photoaging. **Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.63, n.1-3, p.41-51, 2001.

WOLF, R.; WOLF, D.; MORGANTI, P.; RUOCCO, V. Sunscreens. **Clinical Dermatology**, v.19, n.4, p.452-459, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO guidelines on safety monitoring of herbal medicines in pharmacovigilance systems**. Geneva: World Health Organization, 2004. 82p. Disponível em: <http://apps.who.int/medicinedocs/index/assoc/s7148e/s7148e.pdf>. Acesso em: 25 mar 2010.

YAO, L.H.; JIANG, Y.M.; SHI, J.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A.; DATTA, N.; SINGANUSONG, R.; CHEN, S.S. Flavonoids in food and their health benefits. **Plant Foods for Human Nutrition**, v.59, n. 3, p.113-122, 2004.

CAPÍTULO 3

AValiação DA EFICÁCIA FOTOPROTETORA E COMPORTAMENTO REOLÓGICO

1 RESUMO

As técnicas *in vitro* e *in vivo* para a avaliação do Fator de Proteção Solar (FPS) e do Fator de Proteção em relação à radiação UVA (UVA-PF) são muito estudadas e discutidas há muito tempo até a atualidade. Foi feita a revisão das técnicas para as avaliações de FPS e FPA *in vitro* preconizadas pela FDA (*Food and Drug Administration Agency*) e COLIPA (*European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association*). O enfoque maior foi direcionado à análise espectrofotométrica de soluções diluídas e à espectrofotometria de reflectância com esfera integrada. Existe a preocupação da Indústria de Cosméticos em suas formulações fotoprotetoras e dos Órgãos Governamentais no que se refere à eficácia efetiva dos fotoprotetores existentes no mercado quanto aos fatores de FPS, FPA e suas derivações, sendo o método *in vivo*, único atualmente aprovado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária para registro de produtos. O objetivo deste estudo foi o desenvolvimento e avaliação da estabilidade físico-química e funcional em dois diferentes sistemas auto-emulsionados do tipo óleo em água contendo succinato de rutina, filtros químicos (7,5% p/p de 4-metoxycinamato de 2-etilhexila e 3,0% p/p de 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona) e físico (3,0% p/p de dióxido de titânio). Por meio do Teste de Estabilidade Normal num período de 90 dias, as formulações contendo succinato de rutina (**S**) associadas (**MS**) ou não (**M**) aos filtros solares foram submetidas a condições diversas de temperatura, umidade e exposição à radiação solar. Foram analisadas quanto aos parâmetros organolépticos (aspecto, cor e odor), físico-químicos (pH, viscosidade aparente, área de histerese e curva de fluxo) e funcionais (atividade antirradicalar e eficácia fotoprotetora). Durante o período de análises foi verificado que a formulação **MS** apresentou menores diferenças significativas quanto aos parâmetros funcionais e físico-químicos quando incorporada à base cosmética (Crodafos[®]CES + Uniox[®]C). Com estes resultados, a sua funcionalidade foi mantida, que é a proteção solar frente à radiação UVB e supostamente frente à UVA. Nas mesmas condições, as formulações **S** e **M** apresentaram alterações a partir de 15 dias de armazenamento.

Palavras-chaves: espectrofotometria de reflectância; FPS *in vitro*; atividade antirradicalar; succinato de rutina

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Histórico dos estudos de eficácia fotoprotetora

O tema “fotoproteção” envolve a descrição na literatura científica de cosméticos fotoprotetores no mercado:

(a) *Gletscher Crème*[®] (Glacier Cream) – é o relato científico mais antigo sobre fotoprotetor desenvolvido em 1938 por Franz Greiter que, após ter sofrido extensas queimaduras solares por escalar os Alpes. Decidiu criar em um pequeno laboratório instalado na casa de seus pais, um produto que protegesse a pele de maneira eficaz (GREITER, 1984; LOWE, 2006; URBACH, 2001);

(b) *Red Vet Pet*[®] – elaborado em 1944, na Austrália, por Benjamin Greene, protetor à base de petróleo, de cor vermelha e um tanto viscoso. Embora tivesse uso veterinário, foi utilizado pelos soldados da II Guerra Mundial, após observação da presença de queimaduras na pele (GREITER, 1984; LOWE, 2006; URBACH, 2001);

(c) Primeiros estudos referentes à determinação do Fator de Proteção Solar (FPS), realizados primeiramente por Schulze (1963);

(d) Descrição da metodologia de desenvolvimento e avaliação de fotoprotetores que apresentavam resistência à água feita por Franz Greiter em 1984 (GREITER *et al.*, 1979; GREITER, 1984; GREITER; GSCHNAIT, 2008).

O primeiro método padronizado e exigido para a determinação do FPS e a divulgação da definição de termos como a Dose Eritematógena Mínima (MED) foi preconizado pela FDA (*Food and Drug Administration*) nos Estados Unidos (Proposta de Monografia – *Proposed Monograph*), em 1978. Logo após, na Alemanha houve a padronização da Norma DIN 67501 que foi aplicada por toda a Europa. Estas duas normas diferiam nos seguintes quesitos: tipo de fonte geradora da radiação UV (respectivamente, lâmpada de xenônio ou luz natural e de mercúrio); e quantidade de aplicação do produto na pele (2,0 e 1,5 mg/cm²) que gerou discrepâncias nos valores medidos de FPS (DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMUNG. **DIN 67501**, 1984; UNITED STATES, 1978).

Novas versões das Normas da FDA foram publicadas em 1993 (*Tentative Final Monograph*) e houve a regulamentação da versão final (*Final Monograph*) em 1999 (UNITED STATES, 1993 apud AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2002; UNITED STATES, 1999). A mesma implementação ocorreu na Europa, com a COLIPA (Associação de Produtos Cosméticos, de Higiene Pessoal e Perfumes na União Europeia), por

meio de *Guideline* de FPS, 1994, no sentido de aprimorar a avaliação da eficácia fotoprotetora dos produtos desenvolvidos introduzindo, desde então até 2009, técnicas inovadoras para caracterizar e especificar a emissão do espectro da fonte de UV e selecionar os tipos de cor de pele mais adequados ao estudo do FPS (EUROPEAN COSMETICS ASSOCIATION, 1994 apud AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2002; EUROPEAN COSMETICS ASSOCIATION, 2007; EUROPEAN COSMETICS ASSOCIATION, 2009).

Além dos Estados Unidos, outros países têm padronizado as metodologias de avaliação do FPS e o ensaio de resistência à água, por meio de Normas: (a) Norma da Associação da Austrália (SAA) em 1986 e, a última versão em 1998 (AS/NZS 2604:1998), em junção com a Associação à Nova Zelândia; (b) Associação das Indústrias Cosméticas do Japão (JCIA) em 1991 e última versão em 1999 e (c) Norma da África do Sul Bureau (SABS) em 1992 e a última versão em 2002. Em 2002, outros países adotaram as metodologias preconizadas pela FDA e COLIPA, entre eles estão: Coreia, Colômbia, China e do grupo do Mercosul (Brasil, Argentina, Uruguai, Paraguai e Venezuela) (AUSTRALIAN/NEW ZEALAND STANDARD, 1998; EUROPEAN COSMETICS ASSOCIATION, 2006; JAPAN COSMETIC INDUSTRY ASSOCIATION, 1995; MOYAL, 2008).

Entretanto, a determinação do FPS entre as diferentes metodologias apresenta variações como: **(I) seleção de voluntários** – número adequado ao estudo e fototipo de pele, **(II) área testada**, **(III) número e tamanho dos sítios testados**, **(IV) produtos** - quantidade aplicada e procedimento adotado, **(V) simulador solar** – tipo de lâmpada, qualidade e quantidade da luz, **(VI) método de avaliação da Dose Eritematosa Mínima com a área protegida (MEDp) ou não protegida (MEDu)** e **(VII) análise estatística empregada**. O maior desafio por parte da COLIPA e, também, pela FDA envolve a harmonização dos ensaios de medição do FPS e a reprodutibilidade dos resultados (EUROPEAN COSMETICS ASSOCIATION, 2009; UNITED STATES, 2007).

Dentre as preocupações da Comunidade Científica é possível mencionar: metodologias analíticas de avaliação da eficácia do FPS; efeitos evidentes da radiação UVB em relação à pele, entre eles, a fotocarcinogênese; imuno-supressão; queimaduras e bronzeamento da pele. Os primeiros registros de dados desta eficácia foram publicados nos Estados Unidos (Proposta de Monografia – *Proposed Monograph*), em 1978, pelos quais as formulações ensaiadas continham os seguintes filtros químicos: o ácido *p*-aminobenzoico (PABA) e o seu derivado, octildimetil PABA, resultando em FPS entre 2 a 10, raramente continham proteção frente à radiação UVA (COLE, 2001). O uso do PABA foi suspenso em alguns produtos conhecidos como “PABA-free”, a partir dos anos 80, pois estavam causando resposta auto-imune nos

usuários sensibilizando-os e, além disso, sua degradação poderia produzir nitrosaminas (potencial carcinogênico) (WOLF *et al.*, 2001).

Entre os anos de 1979 e 1980, a eficácia dos fotoprotetores foi estendida, também, em relação à radiação UVA, no intervalo de 315 a 400 nm, havendo a associação nas formulações fotoprotetoras de filtros químicos com ação frente a radiação UVA, como os derivados do dibenzoilmetano (4-isopropildibenzoilmetano e 4-*tert*-butil-4'-metoxidibenzoilmetano) e oxibenzona (benzofenona-3), e também, outros filtros com ação frente a radiação UVB, como octocrileno, classe dos antranilatos e cinamatos (ROELANDTS, 1998; WOLF *et al.*, 2001).

A partir da década de 1980, houve continuidade dos estudos relacionados aos danos da radiação UVA na pele, não tão evidentes quanto à ação da radiação UVB (KLIGMAN; AKIN; KLIGMAN, 1985). Estes danos foram relacionados a efeitos crônicos, entre eles, elastose dérmica, carcinogênese escamosa (modelo animal) e aumento do número de casos de melanoma, sendo a razão de contribuição em relação à radiação UVA e UVB de 4:1 (COLE, 2001; KLIGMAN; AKIN; KLIGMAN, 1985). O uso dos filtros físicos ou inorgânicos apresentou aumento a partir do ano de 1989, com o dióxido de titânio e óxido de zinco. A incorporação inicial destes filtros era realizada sob a forma não micronizadas, medindo entre 200-500 nm (dióxido de titânio) e 200-300 nm (óxido de zinco). O uso destes filtros tornou-se mais comum após 1992, com o processo de micronização: 10-50 nm (dióxido de titânio – proteção em UVB em 308 nm e UVA em 320-340 nm) e 60-80 nm (óxido de zinco – proteção frente à radiação UVA) (ROELANDTS, 1998).

Na atualidade, existe a preocupação da Indústria de Cosméticos e dos Órgãos Governamentais no desenvolvimento das formulações fotoprotetoras efetivas, avaliando os fatores de FPS (UVB) e PPD (Pigmentação Escurecida e Persistente) ou UVA-PF (Fator de Proteção em relação à radiação UVA), tanto *in vitro* como *in vivo* (EUROPEAN COSMETICS ASSOCIATION, 2009; UNITED STATES, 2007). Este fato decorreu do conhecimento que a exposição às radiações UVA e UVB estava associada ao dano cumulativo da pele durante os anos de vida que o indivíduo se expõe, tais como envelhecimento cutâneo e a predisposição ao câncer de pele, sendo o mais frequente dentre todos os casos de câncer (25% de incidência) (BARON *et al.*, 2008; INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2008).

Os métodos padronizados para avaliação de FPS descritos na literatura podem orientar nos procedimentos de avaliação, porém, no Brasil, para o registro de cosméticos fotoprotetores, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) – Gerência Geral de Cosméticos exige a utilização da metodologia *in vivo*, de acordo com a Resolução RDC nº 237 de 22 de agosto de 2002 que está fundamentada nos testes preconizados pela Norma FDA

(UNITED STATES, 1993 apud AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2002; UNITED STATES, 1999) e pela Norma COLIPA (EUROPEAN COSMETICS ASSOCIATION, 1994 apud AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2002).

O método de PPD ou UVA-PF é recomendado pela Associação das Indústrias Cosméticas do Japão (JCIA) e é também utilizado nos Estados Unidos (JAPAN COSMETIC INDUSTRY ASSOCIATION, 1995; UNITED STATES, 2007) e, atualmente, no Brasil está em fase de discussão junto à ANVISA. Outros métodos de avaliação dos fotoprotetores quanto a proteção à radiação UVA estão descritos na **Norma Australiana e Neo-Zelandesa** (AUSTRALIAN/NEW ZEALAND STANDARD, 1998), no **Novo Método COLIPA UVA** (EUROPEAN COSMETICS ASSOCIATION, 2006), no método de **Balanco UVA** (DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMUNG. DIN 67502 (2004) apud MOYAL, 2008), no método **Razão UVA/UVB ou Boot's Star Rating** (BOOT THE CHEMIST, 2004 apud MOYAL, 2008) e no método **Comprimento de Onda Crítico (λ_c)** (DIFFEY *et al.*, 2000; SPRINGSTEEN *et al.*, 1999).

2.2 Metodologias de análise da eficácia fotoprotetora *in vivo*

O princípio da avaliação do FPS, também conhecido como o nome de **FPS estático**, comumente utilizado no Brasil e aceito pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) envolve o aparecimento da resposta eritematogênica perceptível na pele, com bordas claramente definidas, após a exposição à radiação UVB (16 a 24 horas) e cuja intensidade é proporcional à quantidade de energia efetiva formadora de eritema (Joules efetivos por metro quadrado - J/m²-eff) e utiliza-se um simulador solar. Esta quantidade de energia efetiva formadora de eritema leva o nome de **MED** (Dose Eritematogênica Mínima). O simulador solar é um equipamento que utiliza lâmpadas de arco de xenônio que, por meio de filtros específicos, emite radiação na faixa UVB e UVA (290-400 nm), similar à luz solar (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2002; EUROPEAN COSMETICS ASSOCIATION, 2006; FLOR *et al.*, 2007; LOWE, 2006; UNITED STATES, 2007).

O valor do FPS (**Equação 1**) consiste na razão entre a dose aplicada de radiação UVB necessária para desenvolver o eritema na pele protegida pelo protetor solar e a dose necessária para o mesmo efeito, com a pele desprotegida, sem aplicação de qualquer produto. De outra forma, é definido como a dose (quantidade de energia) em relação ao tempo que permite a exposição à radiação até surgimento do eritema (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2002; EUROPEAN COSMETICS ASSOCIATION, 2006; FLOR *et al.*, 2007;

LOWE, 2006; UNITED STATES, 2007).

$$\text{FPS} = \frac{\text{MED (pele protegida)} \text{ (J/m}^2\text{-eff)}}{\text{MED (pele desprotegida)} \text{ (J/m}^2\text{-eff)}}$$

Equação 1. Determinação do Fator de Proteção Solar *in vivo* (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2002)

Onde:

FPS – Fator de Proteção Solar

MED – Dose Eritematógena Mínima

(J/m²-eff) - Energia efetiva formadora de eritema (Joules efetivos por metro quadrado)

Para tal determinação, é preconizado no Brasil o emprego de metodologia *in vivo* com voluntários sadios (≥ 10 ou ≥ 20 , depende da metodologia empregada ou COLIPA ou FDA) e com Fototipos I, II e III (pele extremamente sensível, muito sensível e sensível, respectivamente, segundo Fitzpatrick), de acordo com Resolução RDC nº 237/02 de 22 de agosto de 2002. A exclusão dos voluntários ao ensaio se aplica aos que apresentam a pele com eczemas, psoríase ou qualquer variedade de neoplasia. O tempo de observação quanto à formação do eritema ocorre no período de 20 a 24 horas. O produto é aplicado na região dorsal (entre a linha da escápula até a cintura, onde áreas com protuberância óssea devem ser evitadas) e a quantidade de produto aplicado deve ser de $2 \text{ mg/cm}^2 \pm 2,5\%$ e um tempo de espera de secagem de pelo menos 15 minutos para o início do ensaio. Para a determinação da **MED**, a delimitação de cada sítio (retângulo) deve ser de 30 cm^2 , dividindo 6 círculos de análise internamente com as mesmas medidas do simulador solar, conforme apresentado na **Figura 1**. No caso de determinação para a pele desprotegida deve ser administrada uma série de 5 doses de radiação UV ($\text{J/m}^2\text{-eff}$) selecionadas em progressão geométrica ($1,25^n$) ou 25% maior que a dose anterior (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2002; EUROPEAN COSMETICS ASSOCIATION, 2006; FITZPATRICK, 1975; UNITED STATES, 2007).

Figura 1. Aplicação da radiação UV por um simulador solar num sítio delimitado no dorso do voluntário. A fotografia do sítio foi ampliada e mostra padrões de eritema resultantes da dose de radiação UV aplicada (NEVES, 2008)

Existe, também, a determinação do **FPS com resistência à água** (40 min de imersão na água) e **FPS muito resistente à água e ao suor** (80 min de imersão na água). O teste *in vivo* é o mais aceito pelos Órgãos Governamentais tanto pela COLIPA quanto pela FDA (EUROPEAN COSMETICS ASSOCIATION, 2005; UNITED STATES, 1993 apud AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2002; UNITED STATES, 2007). A primeira parte da metodologia é parecida com as condições realizadas pelo FPS estático, primeiramente, o fotoprotetor é aplicado no dorso dos voluntários numa área de 50 cm² na quantidade de 2 mg/cm² de produto e é aguardado um período de 15 a 30 min para a secagem do produto.

No teste de **FPS com resistência à água**, a aplicação do produto é realizada no voluntário e permanece 15 minutos fora da imersão (tempo de secagem), depois é imerso em banheira ou piscina por 20 minutos e 20 minutos fora da piscina, sendo feita a exposição à radiação UVB e, posteriormente, a leitura.

Na avaliação do **FPS muito resistente à água e ao suor**, este procedimento é realizado com a imersão do voluntário em quatro momentos de 20 minutos cada e um intervalo de 15 minutos entre cada intervalo para a secagem do voluntário, sendo que por último é realizada a exposição à radiação UVB e, posteriormente, a leitura. Para ambos os testes, a água utilizada é potável e limpa à temperatura de 23-32°C em piscina interna com turbilhonamento e/ou banheira tipo *Jacuzzi*. Para a FDA, o valor de FPS discriminado no rótulo é resultado da média de valores lidos após as leituras de imersão na banheira e para a COLIPA, o valor admitido (após a imersão na banheira em ambos os casos) no rótulo é maior ou igual a 50% da média de valores de FPS estático (EUROPEAN COSMETICS ASSOCIATION, 2005; GREITER *et al.*, 1979; KAIDBEY, 1991; UNITED STATES, 1993 apud AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2002; UNITED STATES, 2007).

Na avaliação da proteção UVA, o método mais comumente utilizado envolve o cálculo de **PPD** (Pigmentação Escurecida e Persistente) ou **UVA-PF** (Fator de Proteção em relação à radiação UVA), conforme indicado na **Equação 2**. O princípio se baseia na resposta de pigmentação tardia (2 a 4 horas) ou persistente da pele frente à exposição da radiação UVA, pois seu escurecimento é uma das respostas mais imediatas a este tipo de exposição. Neste método *in vivo* é analisada a resposta de pigmentação na pele de dez voluntários sadios com peles Fototipos II, III e IV (pele muito sensível, sensível e moderadamente sensível, respectivamente, segundo Fitzpatrick), com relação à Dose Mínima de Pigmentação Persistente (**MPD**) formada após a irradiação usando um simulador solar (espectro de emissão entre 320 a 400 nm) e realizada a leitura depois de 2 a 4 horas (EUROPEAN COSMETICS

ASSOCIATION, 2009; BARON *et al.*, 2008; MOYAL, 2008; EUROPEAN COSMETICS ASSOCIATION, 2007; PISSAVINI *et al.*, 2007; MOYAL *et al.*, 2006; CHARDON *et al.*, 1998; FITZPATRICK, 1975).

$$\text{PPD ou UVA-PF} = \frac{\text{MPD (pele protegida) (J/m}^2\text{)}}{\text{MPD (pele desprotegida) (J/m}^2\text{)}}$$

Equação 2. Determinação do Fator de Proteção em relação a radiação UVA ou da Pigmentação Escurecida e Persistente (EUROPEAN COSMETICS ASSOCIATION, 2009)

Onde:

PPD – Pigmentação Escurecida e Persistente

MPD – Dose Mínima de Pigmentação Persistente

UVA-PF - Fator de Proteção em relação a radiação UVA

(J/m²) - Joules por metro quadrado

A dose da radiação UVA irradiada por um simulador solar é semelhante à exposição solar (10-20 J/cm²) sobre uma pele desprotegida e equivale a 1(uma) hora de exposição. Os índices de proteção à radiação UVA podem variar de 4 a 28. Este método é recomendado pela Associação das Indústrias Cosméticas do Japão (JAPAN COSMETIC INDUSTRY ASSOCIATION, 1995 apud MOYAL, 2008) e oficializado neste mesmo país, que devido à não-correlação direta do valor de PPD com o nível de proteção, a legislação japonesa recomenda o uso de uma classificação alternativa baseada nos valores obtidos para o **PPD** (**Quadro 1**). Porém, o uso dos símbolos “+” não é obrigatório (BARON *et al.*, 2008; CHARDON *et al.*, 1998; JAPAN COSMETIC INDUSTRY ASSOCIATION, 1995 apud MOYAL, 2008; MOYAL *et al.*, 2006; MOYAL, 2008; PISSAVINI *et al.*, 2007).

Quadro 1 – Classificação de Proteção em relação à radiação UVA (**PA**) do Sistema Japonês e valores de **PPD** (Pigmentação Escurecida e Persistente) (JAPAN COSMETIC INDUSTRY ASSOCIATION, 1995 apud MOYAL, 2008)

PPD	PA
2 – 4	+
4 – 8	++
> 8	+++

Um outro método que consta na literatura é o cálculo de IPD (Pigmentação Escurecida Imediata) e envolve a observação do escurecimento transitório da pele (bronzamento) de 10 voluntários sadios com peles Fototipos II, III e IV (pele muito sensível, sensível e moderadamente sensível, respectivamente, segundo Fitzpatrick), sendo que a dose de UVA

corresponde a um baixo limiar numa faixa que varia entre 0,2 a 6,0 J/cm² e, imediatamente, após 1 a 15 min de exposição, o efeito desaparece (FITZPATRICK, 1975; MOYAL, 2008). A resposta de IPD induzida pela radiação UVA é dependente da intensidade emitida pela fonte de xenônio e pode variar entre 2-100 mW/cm². O comprimento de onda induzido de eficiência máxima de IPD é, aproximadamente, de 340 nm, sendo realizado de 320 a 400 nm (MOYAL, 2008; ROUTABOUL *et al.*, 1999). Este ensaio pode gerar resultados duvidosos, pois a tendência é superestimar o valor de proteção dos fotoprotetores, pois o limiar da intensidade de dose da fonte usada é menor que a da luz solar incidente atenuada pelos fotoprotetores. Além disso, os resultados geram uma baixa reprodutibilidade, devido ao tempo de leitura ser muito curto e não ter ocorrido a estabilização da curva de pigmentação. Por estes motivos, este método não é preconizado pela FDA e nem pela COLIPA (MOYAL, 2008; ROUTABOUL *et al.*, 1999).

2.3 Metodologias de análise da eficácia fotoprotetora *in vitro*

As análises do fator de proteção à radiação UVB e UVA *in vivo*, principalmente a metodologia do FPS e PPD ou UVA-PF, preconizadas pelos Órgãos descritos anteriormente, são empregadas e aceitas por diversos países, porém são complexas e possuem custo elevado, principalmente por envolver tecnologia onerosa, condições de trabalho padronizadas, contratação de técnicos especializados e o emprego de voluntários humanos. Devem ser utilizadas na etapa final do desenvolvimento de formulações fotoprotetoras e não são empregados na avaliação “lote a lote” de uma linha de produção de uma empresa. Pelos motivos apresentados, existem várias vantagens em utilizar as metodologias *in vitro* durante o desenvolvimento de formulações cosméticas, visando selecionar as de melhor desempenho como: não exposição ao risco, pois não é necessária a presença de voluntários humanos; rapidez de execução; custo acessível; reprodutibilidade; facilidade no treinamento do operador, utilização de diversas amostras simultânea e comparativamente existe correlação com os resultados obtidos de estudos *in vivo* (FLOR *et al.*, 2007; LOWE, 2006; RAI; SRINIVAS, 2007; SAYRE *et al.*, 2008).

2.3.1 Análise espectrofotométrica de soluções diluídas

A determinação do FPS *in vitro* de filtros químicos pode ser realizada por meio da leitura espectrofotométrica de suas soluções diluídas (também reconhecido como Método de Mansur),

e posterior tratamento matemático, por meio da determinação da transmitância ou da absorvância ($A = -\log T$), utilizando como solventes (e brancos de leitura): metanol, isopropanol ou etanol. Segundo a Lei de Lambert-Beer (1760), a transmitância independe do valor absoluto da luz incidente e a fração desta, que é absorvida pelo meio, é proporcional à distância percorrida e independe da intensidade da luz incidente (fonte de luz natural ou artificial) (MANSUR *et al.*, 1986; SAYRE *et al.*, 1979a). Assim como para a determinação *in vivo*, havia a necessidade de determinação de um fator de proteção, constituído por um único número que representasse o aspecto quantitativo da absorção e a sua localização dentro do espectro do ultravioleta. No entanto, as primeiras tentativas em 1974 demonstraram que não havia correlação entre as metodologias *in vitro* e *in vivo*. Houve a sugestão de avaliação da eficácia dos filtros solares apenas com radiação monocromática de 305 nm considerando como insignificante o efeito eritematogênico das radiações fora desse comprimento de onda.

Sayre e colaboradores (1979a) partiram do princípio de que o FPS é o inverso da transmitância ($FPS = 1/T$) e foi calculado de 5 em 5 nm entre 290 a 320 nm, multiplicando os números da **Equação 3** por ponderações obtidas pela normalização da curva eritematogênica solar, conforme **Quadro 2**. Estas ponderações foram calculadas multiplicando-se o efeito eritemogênico, $EE(\lambda)$, de cada faixa pela intensidade solar, $I(\lambda)$, naquela faixa (SAYRE *et al.*, 1979a; SAYRE *et al.*, 1979b).

A **Equação 3** é uma proposta de simplificação da equação proposta por Mansur e colaboradores (1986) em relação à equação inicial de Sayre e colaboradores (1979a), além disso é acrescida do Fator de Correção (FC), utilizando produtos fotoprotetores do mercado com FPS conhecidos (valor de FPS alto, intermediário e baixo) para que os valores obtidos *in vitro* tivessem correlação com os valores *in vivo*. Os valores ponderais do **Quadro 2** mantiveram-se nos cálculos realizados de FPS, mesmo com a modificação ocorrida na equação.

$$FPS_{\text{espectrofotométrico}} = FC \cdot \sum_{290nm}^{320nm} EE(\lambda) \cdot I(\lambda) \cdot Abs(\lambda)$$

Equação 3. Determinação do Fator de Proteção Solar *in vitro* por análise espectrofotométrica modificada por Mansur *et al.*, 1986

Onde:

FC - Fator de correção, determinado por uma média de 3 formulações contendo filtros químicos cujos valores de FPS são conhecidos

EE (λ) - Efeito eritematogênico da radiação de comprimento de onda determinado (λ)

I (λ) - Intensidade da luz solar no comprimento de onda determinado (λ)

Abs (λ) - Leitura espectrofotométrica da absorvância da solução da preparação no comprimento de onda determinado (λ)

FPS espectrofotométrico - Fator de Proteção Solar espectrofotométrico

Quadro 2 – Ponderação empregada no cálculo de FPS por espectrofotometria, conforme SAYRE *et al.*, 1979(a)

λ (nm)	EE (λ) x I (λ) valores normalizados*
290	0,0150
295	0,0817
300	0,2874
305	0,3278
310	0,1864
315	0,0839
320	0,0180
	1,0000

Legenda:

λ (nm) - Comprimento de onda determinado (nm)

EE (λ) - Efeito eritematogênico da radiação de comprimento de onda determinado (λ)

I (λ) - Intensidade de luz solar no comprimento de onda determinado (λ)

* Segundo Sayre *et al.*, 1979a.

Este método é simples, rápido, com baixo custo, vem sendo desenvolvido desde a década de 50 e demonstrou boa correlação com o método *in vivo*, especialmente, quando se trata de produto apresentado em emulsão, segundo os resultados divulgados por Sayre e colaboradores (1979a) e Mansur e colaboradores (1986). Apesar de suas vantagens, existem limitações que incluem: (a) não avaliação da aderência, penetração e distribuição dos produtos na pele (por se tratar da leitura espectrofotométrica de uma formulação diluída), (b) diminuição da precisão da análise de produtos oleosos devido à diluição realizar-se com solventes voláteis causando uma concentração do produto, (c) análise de fotoprotetores contendo filtros físicos (dióxido de titânio e óxido de zinco), em função da insolubilidade destes nos solventes comumente utilizados, acarretando erros de leitura por se tratar de soluções não-transparentes (SAYRE *et al.*, 1979a; SAYRE *et al.*, 1979b).

No trabalho de Santos *et al.* (1999) foi realizado um estudo comparativo entre os valores de FPS de fotoprotetores em loção contendo 4-metoxicinamato de 2-etilhexila, obtidos pelo Método de Mansur (*in vitro*) e por metodologia *in vivo*. Foram avaliados três fotoprotetores em loção com concentrações de 2,0; 4,5 e 7,5% de 4-metoxicinamato de 2-etilhexila, diluídas a 2,0 μ l/mL, em etanol P.A. e foram realizadas as leituras em espectrofotômetro, entre 290 a 320 nm.

A metodologia *in vivo* foi realizada com 16 voluntários com fototipos de pele I, II e III. Os valores obtidos no ensaio *in vivo* se correlacionaram com resultados do método *in vitro*. O fotoprotetor em loção a 2,0% de 4-metoxicinamato de 2-etilhexila apresentou valores de FPS

in vitro e *in vivo* de $4,6 \pm 0,05$ e $5,0 \pm 0,1$ respectivamente. O produto que continha 4,5% do filtro apresentou FPS $9,9 \pm 0,01$ na metodologia *in vitro* e $9,8 \pm 2,2$ *in vivo* e a loção a 7,5% teve FPS $15,3 \pm 0,002$ (*in vitro*) e $15,8 \pm 4,4$ (*in vivo*) (SANTOS *et al.*, 1999).

O grupo de pesquisa de Garcia *et al.* (1991) realizou a observação utilizando diferentes tipos de filtros solares (salicilato de homomentila; sal monossódico do ácido 2,2'-bis-(2,4-fenileno)-1H-benzimidazol 4,6-dissulfônico; 4-dimetil-aminobenzoato de etila; 1-(4-terc-butilfenil)-3-(4-metoxifenil) propano-1,3-diona, 3-benzilideno cânfora; 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona; 4-metoxicinamato de 2-etilhexila) em três níveis de concentração (mínima, intermediária e máxima), seguindo metodologia da FDA (SHAATH, 1990).

Os valores de FPS das formulações foram determinados pelo método de Mansur. Foram constatadas que as formulações que continham o 4-dimetil-aminobenzoato de etila nas concentrações de 1,5; 4,0; e 8,0% tiveram valores de FPS 3, 7 e 15, respectivamente, aquelas com 2,0; 4,5; e 7,5% apresentavam FPS de 4, 7 e 12, respectivamente. A conclusão deste trabalho o Método de Mansur se apresentou viável e forneceu informações importantes no desenvolvimento destas formulações (GARCIA *et al.*, 1991).

O trabalho de Rosa *et al.* (2008) avaliou espectrofotometricamente o FPS de extratos vegetais aquosos de *Achillea millefolium*, *Brassica oleracea* var. *capitata*, *Cyperus rotundus*, *Plectranthus barbatus*, *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cass e *Sonchus oleraceus*. A análise espectral a partir da concentração de 10% (massa de planta triturada/volume de água) demonstrou que os extratos promoveram fotoproteção nas regiões, tanto UVA, quanto UVB, resultando em FPS aproximadamente, de 8 para *Achillea*, 6 para *Sonchus*, 5 para *Porophyllum* e *Brassica*, 2 para *Plectranthus* e 1 para *Cyperus*. Os autores concluíram que estudos como este, são relevantes na pré-seleção de espécies vegetais que apresentam potencial de FPS de forma conveniente e de custo reduzido (ROSA *et al.*, 2008).

2.3.2 Determinação da eficácia fotoprotetora *in vitro* por transmitância difusa

2.3.2.1 Transmitância difusa e geometria óptica

Outro método *in vitro* descrito na literatura para a avaliação de FPS de protetores solares envolve a transmitância difusa. O espalhamento de luz incidida sobre os produtos fotoprotetores como sistemas opacos é realizado conforme distribuição hemisférica representada na **Figura 2**. A intensidade de radiação é maior na proximidade da incidência para a direção regular transmitida (direção hemisférica). A principal vantagem deste método é a determinação do FPS de formulações contendo filtros físicos, como o dióxido de titânio e

óxido de zinco (LEVY, 2007; SPRINGSTEEN *et al.*, 1999).

Figura 2. Espalhamento da luz incidente sobre a amostra do fotoprotetor. Adaptação de SPRINGSTEEN *et al.*, 1999

A transmitância hemisférica total é medida pelo uso de uma esfera de integração que coleta a luz dispersada em todos os ângulos. A geometria para este caminho de espalhamento da luz é conhecida como normal/hemisférico (incidência/transmitância difusa) e é, frequentemente, abreviado pelo símbolo $0^\circ/d$ e conhecida por geometria difusa. O fotodetector para decodificação da luz em dados fica dentro da esfera integrada e no caso da reversa (**Figura 3**) o fotodetector fica fora (SPRINGSTEEN *et al.*, 1999).

Ao longo dos anos, muitos pesquisadores da engenharia óptica estudaram meios de elevar a eficiência do sistema radiométrico dos instrumentos de medição da transmitância difusa. Construíram-se aparelhos com sistemas de melhor razão sinal/ruído, pois o ruído interferia significativamente no sinal dos resultados experimentais, além da menor exposição da amostra ao meio de uma luz UV. A melhor construção da geometria radiométrica para atender estes parâmetros de análise foi aquela elaborada em sua ordem reversa abreviada como $d/0^\circ$ (difusa/normal), conforme indicado na **Figura 3** (SPRINGSTEEN *et al.*, 1999).

Figura 3. Geometria difusa/normal ($d/0^\circ$). Adaptação de SPRINGSTEEN *et al.*, 1999

O analisador de transmitância UV com tecnologia de esfera integradora utiliza o desenho óptico com a geometria descrita anteriormente. A lâmpada de xenônio com energia suficiente para o intervalo espectral de 250 a 450 nm é usada no interior da esfera integradora. A amostra é aplicada em substratos (simuladores alternativos da pele humana), sob a forma de camada de

2 mg/cm² ou 2 µL/cm². O caminho óptico da passagem da luz é de 10 mm (1 cm) de diâmetro (MOYAL, 2008; LEVY, 2007; SPRINGSTEEN *et al.*, 1999).

2.3.2.2 Parâmetros analíticos

- **FPS *in vitro***: a determinação envolve a medida da transmitância espectral dos comprimentos de onda UV entre 290 e 400 nm, com o intuito de avaliação de FPS (**Equação 4**) e FPA (DIFFEY *et al.*, 2000; EUROPEAN COSMETICS ASSOCIATION, 2007; PISSAVINI *et al.*, 2007; RAI; SRINIVAS, 2007; SAYRE *et al.*, 1979a; SPRINGSTEEN *et al.*, 1999).

$$SPF_{in\ vitro} = \frac{\int_{\lambda=290nm}^{\lambda=400nm} E(\lambda) \times I(\lambda) \times d\lambda}{\int_{\lambda=290nm}^{\lambda=400nm} E(\lambda) \times I(\lambda) \times 10^{-A_0(\lambda)} \times d\lambda}$$

Equação 4. Determinação do Fator de Proteção Solar *in vitro* por meio da transmitância difusa com esfera de integração (SPRINGSTEEN *et al.*, 1999)

Onde:

E (λ) - Eficácia espectral de desenvolvimento de eritema (290–320 nm)

I (λ) - Região espectral relativa onde abrange a radiação solar (300– 400 nm)

A₀ (λ) - Medidas de absorbância da camada de produto na placa antes da exposição à radiação UV

d (λ) - Leitura realizada pelo equipamento feita de 290-400 nm, de 1 em 1 nm

O trabalho de pesquisa de Diffey *et al.* (2000) apresentou o potencial fotoprotetor de vários filtros químicos (**Figura 4**) de 59 formulações comerciais. Houve a avaliação dos valores dos comprimentos de onda críticos, assim como a medição do espectro de cada filtro químico incorporado em emulsões óleo em água (O/A).

O experimento foi realizado por meio da transmitância difusa com esfera de integração, usando o substrato de colágeno sintético hidratado (*Vitro-Skin*[®]) e comprimento de onda de 290 a 400 nm. Os autores concluíram que esta metodologia *in vitro* pode ser usada rotineiramente pela Indústria Cosmética, pois possui baixo custo e foi confiável para a medição da proteção solar de amplo espectro dos filtros químicos incorporados. Neste ensaio, não houve a preocupação da determinação dos valores de FPS e, sim de outros parâmetros, como comprimento de onda crítico e razão UVA/UVB (DIFFEY *et al.*, 2000).

Figura 4. Bandas de absorção e comprimentos de onda críticos para os filtros químicos mais usados (DIFFEY *et al.*, 2000)

Filtro UV (INCI)	Concentração (%) [*]	Comprimento de onda (nm)												λ_c (nm)
		290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400	
PBSA (2-phenylbenzimidazole -5-sulfonic acid)	4													324 [†]
OSAL (octyl salicylate)	5													327
HSAL (homosalate)	15													328
OPABA (octyldimethyl PABA)	8													330
OMC (octyl methoxycinnamate)	7.5													339
OCTO (octocrylene)	10													356
OXY (oxybenzone)	6													361
MAN (menthyl anthranilate)	5													363
TiO ₂ (titanium dioxide)	25													379 ^{‡,§}
ZnO (zinc oxide)	25													382 [‡]
AVO (avobenzon)	3													383

Legenda:

λ_c - Comprimento de onda crítico

As barras em preto representam a abrangência de radiação UV e é baseada em determinações espectrofotométricas. Os filtros foram preparados em emulsões óleo em água (O/A). As barras mais claras representam o pico de absorção de cada filtro

^{*}A concentração máxima estabelecida pela literatura de produtos fotoprotetores (PEARSE; EDWARDS, 1993)

[†] Determinado em emulsão O/A a 2%

[‡] Determinado em emulsão O/A a 15%

- **Comprimento de onda crítico (λ_c).** É aquele que corresponde a, pelo menos, 90% da curva integral de absorbância entre os comprimentos de onda de 290 a 400 nm ($R \geq 0,9$, conforme a **Equação 5**). Um fotoprotetor, para ser indicado como adequado na proteção frente à radiação UVA, deve apresentar valor de λ_c maior que 370 nm. Quanto maior o valor de λ_c , maior será a proteção frente à radiação UVA. No entanto, ele não leva em consideração a intensidade de todo espectro de absorção, possibilitando que um filtro com proteção inferior possa apresentar mesmo valor de λ_c que outro, com proteção superior (**Equação 5**) (DIFFEY *et al.*, 2000; FERRERO *et al.*, 2006; MOYAL, 2008; RAI; SRINIVAS, 2007; RUDOLPH, 2004; SPRINGSTEEN *et al.*, 1999).

$$R = \frac{\int_{290nm}^{\lambda} A\lambda \cdot d\lambda}{\int_{290nm}^{400nm} A\lambda \cdot d\lambda}$$

Equação 5. Determinação do comprimento de onda crítico (SPRINGSTEEN *et al.*, 1999)

Onde:

A (λ) - Absorbância espectral da amostra medida por meio da transmitância difusa com esfera de integração

d (λ) - Leitura realizada pelo equipamento feita de 290-400 nm, de 1 em 1 nm

R - razão for $\geq 0,9$, então o primeiro valor de comprimento de onda a ser considerado.

A descrição dos níveis de proteção (razão UVA/UVB) com relação ao λ_c estão informados no **Quadro 3** (DIFFEY *et al.*, 2000; MOYAL, 2008; RUDOLPH, 2004; SPRINGSTEEN *et al.*, 1999).

Quadro 3 – Intervalo de comprimentos de onda críticos e sua relação com o nível de proteção a razão UVA/ UVB (DIFFEY *et al.*, 2000; SPRINGSTEEN *et al.*, 1999)

λ_c	Nível de proteção (Razão UVA/UVB)
$340 \text{ nm} \leq \lambda < 370 \text{ nm}$	Intermediária
$\lambda_c > 370 \text{ nm}$	Maior (amplo espectro)

No trabalho de Velasco *et al.*, (2008b) foi determinada a eficácia fotoprotetora UVB (FPS) e UVA (*Boot's Star Rating*, a razão de UVA/UVB e o comprimento de onda crítico - λ_c), utilizando a espectrofotometria de transmitância difusa com esfera de integração. A determinação foi realizada em amostras de formulações fotoprotetoras contendo rutina, extrato seco de *Passiflora incarnata* L. e extrato glicólico de *Plantago lanceolata* (ambos os extratos com concentração equivalente em 0,1% p/p em rutina isolada), associados ou não com filtros químicos (7% p/p de 4-metoxicinamato de 2-etilhexila e 2% p/p de 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona) e físico (2% p/p de dióxido de titânio). Entre as doze (12) associações dos filtros UV, foi concluído que a associação do extrato seco de *Passiflora incarnata* L. com 7% (p/p) de 4-metoxicinamato de 2-etilhexila, 2% (p/p) de 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona e 2% (p/p) de dióxido de titânio apresentou um FPS de $20,072 \pm 0,906$; e o aumento da proteção contra a radiação UVA com razão de UVA/UVB de 0,49 (sem a presença do extrato) para 0,52 (com a presença do extrato), e o comprimento de onda crítico de 364 para 368,6 nm. Estas associações com extratos vegetais interagem de formas diversas com os filtros químicos e físicos, aumentando ou diminuindo alguns desses parâmetros por um complexo mecanismo

fotoquímico, não elucidado até o momento (VELASCO *et al.*, 2008b).

Em um outro estudo, Gilles *et al.* (2003) determinaram a eficácia fotoprotetora quanto à radiação UVA da avobenzona e 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona em formulações isoladas de 0 a 5% p/p de cada filtro, empregando a Espectroscopia de Reflectância Difusa (DRS), *Phototest*[®] em humanos e técnica *in vitro* (aparelho *Optometrics*[®]) no intervalo de 320 a 400 nm. Para as medidas do ensaio de DRS, foram selecionados 20 voluntários e a leitura foi realizada após 20 minutos de aplicação em áreas das costas (5 cm x 10 cm). Para o *Phototest*[®], foram utilizados 10 voluntários e a medida foi o valor de PPD (Pigmentação Escurecida e Persistente) como indicador biológico. Os resultados obtidos deste trabalho foram que os dois métodos realizados com voluntários foram próximos daqueles obtidos com o teste *in vitro*. As formulações com 1,0; 3,0 e 5,0% de 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona apresentaram valores de FPA na metodologia DRS *in vivo* de $2,33 \pm 0,27$; $3,90 \pm 0,83$ e $4,99 \pm 0,81$, respectivamente. No teste com o *Phototest*[®], os valores obtidos foram de $1,8 \pm 0,4$; $2,9 \pm 0,3$ e $3,7 \pm 1,1$, respectivamente e na metodologia *in vitro* (*Optometrics*[®]) os valores de FPA foram 2,51; 4,12 e 5,64, respectivamente (GILLES *et al.*, 2003).

As formulações com 1,0; 3,0 e 5,0% de avobenzona resultaram em valores de FPA na metodologia DRS *in vivo* de $4,05 \pm 0,33$; $7,90 \pm 1,24$ e $10,48 \pm 2,12$, respectivamente, no *Phototest* foram obtidos os resultados de $4,6 \pm 1,0$; $8,6 \pm 2,5$ e $10,6 \pm 2,2$, respectivamente e na metodologia *in vitro* (*Optometrics*), apresentaram valores de FPA de 4,63; 6,21 e 11,75, respectivamente (GILLES *et al.*, 2003).

- **Razão UVA/UVB ou Boot's Star Rating:** envolve a medida de absorção da formulação no intervalo de 290 a 400 nm. Após isto, é elaborado o cálculo da razão das áreas sob a curva da radiação UVA em relação à UVB (**Equação 6**) (BOOT THE CHEMIST, 2004 apud MOYAL, 2008; RUDOLPH, 2004; SPRINGSTEEN *et al.*, 1999).

A transmitância espectral medida (T_λ) é convertida a valores de absorbância espectral $A_\lambda = -\log(T_\lambda)$.

$$\frac{\alpha_{UVA}}{\alpha_{UVB}} = \frac{\int_{320nm}^{400nm} A_\lambda \cdot d\lambda}{\int_{290nm}^{320nm} A_\lambda \cdot d\lambda}$$

Equação 6. Determinação da razão UVA/UVB (BOOT THE CHEMIST, 2004 apud MOYAL, 2008)

Onde:

A (λ) - Absorbância espectral da amostra (medida por meio da transmitância difusa com esfera de integração)

d (λ) - Leitura realizada pelo equipamento feita de 290-400 nm, de 1 em 1 nm

A razão entre a curva UVA/UVB é determinada e associada com a proteção anti-UVA. Os resultados podem ser expressos com símbolos de estrelas, sendo que o maior número destas corresponde com proteção anti-UVA estimada de maior magnitude (**Quadro 4**). Da mesma forma que o comprimento de onda crítico, é um método relativo, ou seja, apresenta informações sobre uma região do ultravioleta em relação a outra. Isso significa que dois produtos com o mesmo resultado não necessariamente terão o mesmo perfil espectrofotométrico (BOOT THE CHEMIST, 2004 apud MOYAL, 2008; LEVY, 2007).

Quadro 4 – Sistema *Boot's Star Rating* relacionado com a razão UVA/UVB conforme *Revised Guidelines to the Practical Measurement of UVA* (BOOT THE CHEMIST, 2004 apud MOYAL, 2008)

Razão UVA	Proteção Anti-UVA	
	Estrelas	Descrição ^a
0,0 até < 0,2	-	Muito baixa
0,2 até < 0,4	*	Moderada
0,4 até < 0,6	**	Boa
0,6 até < 0,8	***	Superior
0,8 até < 0,9	****	Máxima
≥ 0,9	*****	Ultra

^aDescrição da relação da razão UVA (proteção a esta radiação) com a quantidade de estrelas

Estudos realizados por Velasco *et al.* (2008a) e Baby *et al.* (2009) evidenciaram que formulações contendo rutina, associada ou não a filtros químicos como o 4-metoxicinamato de 2-etilhexila e 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona apresentaram uma eficácia fotoprotetora *in vitro*. Este ensaio foi realizado por meio da espectrofotometria de transmitância difusa com esfera integradora. Neste estudo, os autores verificaram que a rutina a 0,1% p/p apresentou propriedades fotoprotetoras frente à radiação UVA, apresentando, na forma isolada, valor de comprimento de onda crítico igual a 385 nm, estatisticamente superior a 370 nm, que é um valor indicado como adequado na proteção à radiação UVA (BOOT THE CHEMIST, 2004 apud MOYAL, 2008; SPRINGSTEEN *et al.*, 1999). A razão UVA/UVB para a mesma formulação (rutina 0,1% p/p) gerou valor de $0,95 \pm 0,13$, que correlaciona a área de absorção de UVA em relação à radiação UVB e este valor, quando superior a 0,92 representa proteção maior. No entanto, as associações deste flavonoide com os filtros 4-metoxicinamato de 2-

etilhexila e 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona, nas proporções distintas empregadas, resultaram na diminuição desses parâmetros variando de 0,44 a 0,50 (BABY *et al.*, 2009; VELASCO *et al.*, 2008a).

2.3.2.3 Relação entre comprimento de onda crítico (λ_c), razão UVA/UVB e a eficácia fotoprotetora UVA *in vitro*

- Considerações iniciais

Muitos autores criticam as metodologias do comprimento de onda crítico e razão UVA/UVB quanto às avaliações das formulações fotoprotetoras por serem medidas relativas (num ponto exclusivo) e não absorbâncias “absolutas” que comprovam o potencial de proteção do produto analisado quanto a radiação UVA. Alguns produtos que diferem largamente em índices de UVA-PF PPD *in vivo* podem apresentar leituras de comprimentos de onda crítico ou razão UVA/UVB idênticas. Os índices de fotoproteção calculados nestes métodos são baseados, exclusivamente, em propriedades de absorção dos produtos analisados, não incluindo a interação espectral com o meio biológico, em outras palavras, a ação espectral (FERRERO *et al.*, 2006; RUDOLPH, 2004). No entanto, a Comissão Europeia (2006) e a Conferência da Academia Americana de Dermatologia (2001) sugerem uma alternativa para esta discussão de avaliação dos produtos fotoprotetores: é aceitável uma combinação entre as metodologias de avaliação da eficácia fotoprotetora em relação à radiação UVA *in vivo* e *in vitro*, pois assim teria uma visão mais ampla até dos danos causados pela radiação UVA e da fotodegradação dos produtos, que não seriam possíveis de serem avaliados somente pela metodologia *in vitro* proposta (EUROPEAN COSMETICS ASSOCIATION, 2006; LIM *et al.*, 2001).

Estudos realizados por Ferrero e colaboradores (2006) quanto à reprodutibilidade da razão UVA/UVB e medidas de comprimento de onda crítico em diferentes substratos, indicaram variações significantes em relação à rugosidade das placas usadas. A quantidade de produto aplicada foi de 1 mg/cm², e foi observado que quanto maior a rugosidade do substrato maior o valor dos índices *in vitro* medidos, além de uma grande variabilidade para a medição de razão UVA/UVB (FERRERO *et al.*, 2006). Segundo Diffey *et al.* (2000), as variáveis limites para que a classificação do índice *Boots Star Rating* seja aceitável são: uso da fita de Transpore™ na placa de quartzo e a quantidade de produto aplicado de 2 mg/cm². Entretanto, é esperado que haja uma variação de leituras dependendo das condições de avaliação. O próprio grupo de pesquisa citado propõe uma modificação na metodologia *in vitro*, considerando uma

etapa de pré-irradiação do fotoprotetor analisado antes da leitura, para ser avaliada a interação fotoquímica. Neste estudo foi utilizado o substrato de colágeno sintético (Vitro-skin[®]), a aplicação do produto em 1 mg/cm² e uma pré-irradiação de variações de dose de UV de 0 a 30 J/cm². Com isto foi observado que para os produtos fotoinstáveis, o índice de comprimento de onda crítico diminui quando a dose de UV é aumentada. A conclusão do trabalho enfatizou a importância de ser considerada a fotoinstabilidade dos produtos fotoprotetores e, também, a dificuldade ainda de se correlacionar quantidade de radiação UV adequada *in vitro* com as condições reais *in vivo*, pois as metodologias *in vitro* ainda não estão padronizadas nos compêndios (DIFFEY *et al.*, 2000).

- **Padrão Australiano ou Norma Australiana (e Neo-Zeolandesa):** é um índice de proteção UVA, oficializado pelo governo australiano e é, também, recomendado pela Academia Americana de Dermatologia. O documento é denominado Padrão Australiano ou Neo-Zeolandês e foi denominado de AS/NZS 2604:1998 (Comitê da Nova Zelândia) e regulamenta todas as análises relativas à eficácia de protetores solares, como medição de proteção solar (FPS), teste de resistência à água e medição da proteção em relação à radiação UVA.

A medida da proteção UVA *in vitro* é realizada em espectrofotômetro ou radiômetro, expresso em porcentagem de transmitância entre o comprimento de onda de 320 a 360 nm, sendo composta de três tipos diferentes de procedimentos como segue (MOYAL, 2008; AUSTRALIAN/NEW ZEALAND STANDARD, 1998):

(a) **Método em soluções diluídas de amplo espectro:** o valor de transmitância deve ser menor que 10% entre os comprimentos de onda 320 a 360nm;

(b) **Método em filme:** deve ser formado um filme da amostra com espessura de 8 µm em célula de quartzo e o valor de transmitância deve ser menor que 10%, entre 320 a 360nm;

(c) **Método em placa:** é aplicado um filme com espessura de 20 µm em placa de quartzo com aspecto áspero e o valor de transmitância deve ser menor que 1%, entre 320 a 360 nm.

Este método não analisa a fotoestabilidade do produto, o resultado é qualitativo, não classifica o produto e não correlaciona o resultado com o fenômeno biológico ocorrido.

- **Balanço UVA.** Este método foi desenvolvido na Alemanha e normatizado sob o código DIN 67502:2004. Utiliza resultados *in vivo* e *in vitro* de medida relativa da proteção UVA de protetores solares. Inicia-se fazendo a determinação do coeficiente de ajuste entre o espectro de transmitância do FPS *in vitro* em relação ao valor *in vivo*, numa faixa espectral entre 290 a

400 nm. Depois disto, é realizada a determinação do PPD *in vitro* (faixa espectral entre 320 a 400 nm) por meio do valor do coeficiente de ajuste obtido no cálculo anterior, correlacionando-o com o resultado de medidas de PPD *in vivo*. Finalmente, o valor de Balanço UVA é obtido da correlação entre os dois cálculos anteriormente descritos e resumidos na **Equação 7**.

$$\text{Balanço UVA} = \frac{\text{PPD}(\text{vitro}) - 1}{\text{FPS}(\text{vivo}) - 1} \cdot 100$$

Equação 7. Determinação do balanço UVA (DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMUNG. **DIN 67502**, 2004 apud MOYAL, 2008)

Onde:

PPD – Pigmentação Escurecida e Persistente

FPS - Fator de Proteção Solar

O método Balanço UVA possui correlação com os valores obtidos *in vivo*, reprodutibilidade elevada, é aplicável em todos os tipos de produtos para proteção solar, possibilitando a diferenciação entre os vários fotoprotetores, porém não faz consideração da fotoestabilidade dos filtros envolvidos no sistema (DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMUNG. **DIN 67502**, 2004 apud MOYAL, 2008).

- **Novo Método COLIPA UVA.** Este método vem sendo discutido e publicado pela COLIPA desde 2006 nos *Guidelines* como uma nova metodologia de avaliação da medição de proteção da radiação UVA *in vitro* frente ao método PPD *in vivo* (EUROPEAN COSMETICS ASSOCIATION, 2009; EUROPEAN COSMETICS ASSOCIATION, 2007; EUROPEAN COSMETICS ASSOCIATION, 2006).

Os princípios são muito semelhantes ao Balanço UVA partindo, inclusive, do valor de PPD *in vitro* (faixa espectral entre 320 a 400 nm), por meio do valor do coeficiente de ajuste calculado da correlação do valor de FPS *in vitro* do FPS *in vivo*. Depois disto, é feito um cálculo de ajuste de dose de radiação UVA multiplicando o valor encontrado de PPD *in vitro* encontrado por 1,2 J.cm² (valor determinado por um consenso da COLIPA) e é obtido um novo valor de **PPD *in vitro* final**. Na finalização, existe a realização do cálculo da razão entre o valor de FPS (rotulado *in vivo*) e o de PPD *in vitro* final (**Equação 8**) (EUROPEAN COSMETICS ASSOCIATION, 2007; EUROPEAN COSMETICS ASSOCIATION, 2009; MOYAL, 2008).

$$Razão = \frac{FPS(vivo)rotulado}{PPD(vitro)final}$$

Equação 8. Determinação da razão entre o valor do Fator de Proteção Solar e da Pigmentação Escurecida e Persistente (EUROPEAN COSMETICS ASSOCIATION, 2009)

Onde:

PPD – Pigmentação Escurecida e Persistente

FPS - Fator de Proteção Solar

O valor de PPD *in vitro* do produto é calculado, no mínimo, a partir da média de três leituras. Se o coeficiente de variação entre os valores das placas exceder a 20%, placas adicionais devem ser incluídas nas medidas até que este coeficiente seja atingido. Este método favorece especialmente filtros UVA-I (340 a 400 nm – faixa espectral em que o teste é realizado) de absorbância elevada que sejam fotoestáveis e, acredita-se, que ele seja uma melhoria na qualidade das análises de fotoprotetores quanto a radiação UVA (EUROPEAN COSMETICS ASSOCIATION, 2009; EUROPEAN COSMETICS ASSOCIATION, 2007; MOYAL, 2008).

2.3.2.4 Substratos

O substrato ideal para ser utilizado nesta metodologia deve ser opticamente transparente no espectro UV, simular a textura e porosidade da pele humana. Conforme literatura científica, os substratos recomendados e disponíveis comercialmente são:

- **fita cirúrgica (Transpore[®], 3M)** - seu uso foi descrito por Diffey *et al.* (2000), que avaliaram 15 fotoprotetores, havendo uma correlação dos valores de FPS obtidos em ensaios *in vitro* e *in vivo*. Este substrato possui topografia irregular e o fotoprotetor é distribuído de maneira similar à pele humana. Adicionalmente, a fita é utilizada pelo seu baixo custo (PISSAVINI *et al.*, 2007).

As desvantagens envolvem dificuldades de absorção de formulações alcoólicas e oleosas e pode ocorrer variação no tamanho de poros lote-a-lote (O'NEILL, 1984).

- **membrana de colágeno (Vitro-Skin[®], IMS)** - amplamente utilizada e os resultados apresentam correlação coerente com os obtidos no ensaio *in vivo*. É necessária sua hidratação antes do uso e apresenta textura similar ao estrato córneo. Dentre as desvantagens estão o custo e o tempo de vida útil reduzido, após sua hidratação (DIFFEY *et al.*, 2000; EUROPEAN COSMETICS ASSOCIATION, 2006; SPRINGSTEEN *et al.*, 1999).

- **Filme de poli-cloreto de vinila (Saran Wrap[®])** – é um material de elevada transmitância na região do espectro UV-Vis. Este filme não apresenta textura similar à pele,

porém favorece facilmente a uniformidade da dispersão das amostras sobre sua superfície (O'NEILL, 1984; PEARSE; EDWARDS, 1993; RUDOLPH, 2004; SPRINGSTEEN *et al.*, 1999).

Os demais substratos citados na literatura envolvem a epiderme de camundongo *hairless* (SAYRE *et al.*, 2008; WALTER, 1981), a epiderme humana (FERRERO *et al.*, 2006; PEARSE; EDWARDS, 1993) e o estrato córneo fixado em cianoacrilato (O'NEILL, 1984; PEARSE; EDWARDS, 1993).

A uniformidade do preparo das formulações é um fator importante que é analisado por meio da avaliação de múltiplos pontos de amostra distribuída nos substratos e por meio da avaliação do coeficiente de variação (CV), que pode ser classificado como medida da variação média dos valores de FPS de cada ponto medido: $\leq 10\%$ indica que a amostra foi bem preparada e $> 10\%$ indica que a amostra pode não ter sido muito bem elaborada (EUROPEAN COSMETICS ASSOCIATION, 2006; RAI; SRINIVAS, 2007; SPRINGSTEEN *et al.*, 1999; UNITED STATES, 2007).

2.4 Estabilidade de emulsões e comportamento reológico

A formulação tópica estável é definida como aquela que mantém, dentro de limites específicos e prazo de validade, as mesmas características que apresenta após sua elaboração. Ainda, pode-se dizer que uma emulsão estável é capaz de manter o filme interfásico e as quantidades de cada fase, como exemplo óleo e água, mesmo após exposições a tensões decorrentes de fatores, como temperatura, umidade e agitação. A formulação, também, deve ser capaz de manter a integridade química de seus componentes, evitando alterações indesejáveis, como oxidação e hidrólise, que podem resultar na obtenção de compostos tóxicos e irritantes, afetando a eficácia e segurança do produto (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004; BABY *et al.*, 2004).

Para que seja garantida a estabilidade do sistema, a realização de testes de estabilidade é necessária, assegurando a manutenção das características químicas, físicas, físico-químicas e microbiológicas em função do tempo, sendo possível determinar o seu tempo de prateleira (*shelf-life*) (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004).

O conhecimento do comportamento reológico dos sistemas emulsionados cosméticos e sua relação com a estabilidade físico-química representa importante parâmetro na pesquisa científica e na produção industrial no sentido de caracterizar física e quimicamente a predisposição da formulação de não ser estável frente às variações de tempo, umidade e

temperatura que possam ocorrer (BARRY, 1993; CORRÊA *et al.*, 2005; LASHMAR; BEESLEY, 1993; LEONARDI; MAIA CAMPOS, 2001; TADROS, 2004).

A possibilidade de ocorrer instabilidade pode acontecer desde as etapas do desenvolvimento, passando pela produção, garantia da qualidade e avaliação da eficácia (do produto em cada lote), armazenamento indo até a aplicação do produto final, mantendo as características sensoriais, de viscosidade, de espalhabilidade e de consistência, garantindo a aceitabilidade da formulação pelo consumidor. A receptividade das emulsões, por parte do consumidor depende, principalmente, da eficácia e do sensorial do produto, ambos influenciados pela caracterização reológica (BARRY, 1993; BRUMMER; GODERSKY, 1999; CORRÊA *et al.*, 2005; LEONARDI; MAIA CAMPOS, 2001; TONZAR; 2006).

A interpretação dos resultados da análise reológica define várias situações práticas, como: previsão da capacidade de um produto em resistir às vibrações durante o transporte; possibilidade de ocorrer a separação de fases ou a instabilidade durante o período de armazenamento; facilidade da formulação ser retirada da embalagem, espalhada sobre a pele; os possíveis problemas relacionados com o processo de fabricação, como a dificuldade de bombeamento pelos equipamentos, onde a mistura ou o processo de envase são realizados; e avaliação da aceitação pelo consumidor (BARRY, 1993; BRUMMER; GODERSKY, 1999; LEONARDI; MAIA CAMPOS, 2001; SCHRAMM, 2006).

Cada categoria de produto deve apresentar o comportamento reológico adequado à sua aplicação, sendo conveniente conhecer as velocidades de deformação provocadas pelas operações que estará sujeito (BRUMMER; GODERSKY, 1999; CORRÊA *et al.*, 2005; LEONARDI; MAIA CAMPOS, 2001). Dentro do foco deste trabalho que envolveu o desenvolvimento de formulações fotoprotetoras contendo substâncias antioxidantes, tornou-se de extrema relevância o estudo de parâmetros reológicos (curva de fluxo, área de histerese, viscosidade aparente). Estes parâmetros puderam auxiliar no desenvolvimento de formulações com características sensoriais adequadas e analisar a correlação dos valores de FPS e atividade antirradicalar com o comportamento reológico das formulações em que os filtros solares estavam incorporados ou não com o succinato de rutina.

2.4.1 Conceitos reológicos e a sua importância na área cosmética

A reologia é a ciência que estuda as propriedades de escoamento (fluxo) e de deformação da matéria sob a ação de forças e tensões. As propriedades relacionadas à reologia incluem:

viscosidade, plasticidade e elasticidade (GALLECOS; FRANCO, 1999; TONZAR, 2006; SCHRAMM, 2006).

Os experimentos reológicos envolvidos neste estudo foram experimentos rotacionais, portanto realizados em regime estacionário, que resultaram na obtenção de **curvas de fluxo**. Deste tipo de ensaio, que mede a variação na tensão de cisalhamento como função da taxa de cisalhamento, obtém-se o perfil de fluxo da amostra, podendo-se determinar se a amostra apresenta fluxo Newtoniano ou não-Newtoniano.

Fluidos Newtonianos obedecem à lei de Newton que estabelece que a velocidade do fluxo é diretamente proporcional à tensão aplicada, portanto, a viscosidade independe da taxa de cisalhamento (GALLEGOS; FRANCO, 1999; MONTEIRO, 2004; SCHRAMM, 2006; TADROS, 2004). Nos fluidos não-Newtonianos (sistemas emulsionados), a viscosidade depende da taxa de cisalhamento (dependência não-linear), ou seja, diferentes viscosidades podem ser obtidas de acordo com a variação da velocidade de cisalhamento ou da tensão aplicada, sendo denominadas de **viscosidade aparente** (η') (**Figura 5A**). Esses comportamentos constituem desvios da Lei de Newton e geram tipos diferentes de fluxo: plástico, pseudoplástico e dilatante, com ou sem tixotropia. Nesses fluidos não-ideais ou não-Newtonianos, a viscosidade varia em relação à taxa de cisalhamento, conforme indicado na **Figura 5B** (GALLEGOS; FRANCO, 1999; MONTEIRO, 2004; SCHRAMM, 2006; TADROS, 2004). A maioria das formulações semi-sólidas farmacêuticas e cosméticas apresenta características de fluxo não-Newtoniano e pseudoplástico. No fluido pseudoplástico, a viscosidade varia inversamente com a taxa de cisalhamento e a variação independe do tempo, conforme indicado na **Figura 5B – Curva 2** (GALLEGOS; FRANCO, 1999; SCHRAMM, 2006).

O fluxo pseudoplástico em formulações fotoprotetoras associadas a substâncias antioxidantes auxilia na formação de um filme protetor satisfatório, recobrando a superfície da pele e distribuindo a formulação de forma uniforme com uma espessura adequada, propiciando desta forma a garantia da eficácia fotoprotetora e da atividade antirradicalar e a possibilidade de potencializar ou não o valor de FPS e o fator UVA, podendo estar associado à ação antioxidante das substâncias presentes (GASPAR; MAIA CAMPOS, 2003; LEE *et al.*, 2009; LUPO, 2001).

Figura 5. Curvas representativas do comportamento de fluxo (A), classificando-os em Newtonianos ou não-Newtonianos e a relação da viscosidade e a taxa de cisalhamento indicada na curva de viscosidade (B) (Adaptação de Gallegos; Franco, 1999; Schramm, 2006)

Quanto à dependência do tempo, os fluidos podem apresentar dois tipos de comportamento: reopéxico e tixotrópico, sendo este último o mais comum para sistemas emulsionados (GALLEGOS; FRANCO, 1999; MONTEIRO, 2004; SCHRAMM, 2006). Os fluidos tixotrópicos se caracterizam pelo decréscimo na viscosidade aparente (η') com o passar do tempo, sob condições de taxa ou de tensão de cisalhamento constante, seguido por uma recuperação gradual quando se interrompe o cisalhamento. Portanto, a estrutura deforma-se quando a tensão é aplicada sobre ela, ou seja, a formulação torna-se mais fluida facilitando o espalhamento, mas quando é interrompida, a estrutura original volta a ser a mesma, ou seja, a formulação recupera a viscosidade inicial no momento em que se encerra a aplicação, evitando que o produto escorra da pele (BARNES, 1997; GALLEGOS; FRANCO, 1999; LEE *et al.*, 2009). Esta característica explicada é importante para formulações de uso tópico, principalmente, as fotoprotetoras que têm a função cosmética e no foco da saúde (GASPAR; MAIA CAMPOS, 2003; LEE *et al.*, 2009).

O valor de tixotropia não deve ser muito elevado, evitando que o produto escorra após sua aplicação na pele, em virtude da recuperação muito lenta da sua estrutura. Contrariamente, valores de tixotropia muito baixos geram baixa espalhabilidade e não permitem aplicação homogênea sobre a pele (GASPAR; MAIA CAMPOS, 2003).

A tixotropia pode ser representada quantitativamente pelo *loop* de histerese (forma gráfica a partir da curva de fluxo indicado na **Figura 6**) que se caracteriza pela área entre as curvas ascendente (curva I) e descendente (curva II), demonstrando o comportamento da tensão quando a taxa de cisalhamento é aumentada e é diminuída até cessar, respectivamente. Esta área entre a curva I e a curva II é denominada área de histerese, e o conjunto gráfico é

chamado de reograma, conforme a **Figura 6**. Quanto maior a área de histerese, mais tixotrópico será o sistema (GALLEGOS; FRANCO, 1999; SCHRAMM, 2006).

Figura 6. Reograma indicando o comportamento tixotrópico de um fluido na curva de fluxo ascendente (I) e curva de fluxo descendente (II) formando a área de histerese (Adaptação de Gallecos; Franco, 1999; Schramm, 2006)

2.4.2 Principais grandezas reológicas

A **viscosidade** é uma variável considerada no experimento reológico (**curva de fluxo**), e é definida como a resistência que o produto oferece à deformação ou ao fluxo e depende das características físico-químicas e das condições de temperatura da formulação, sendo que quanto maior a viscosidade, maior é a resistência (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2008; MONTEIRO, 2004; SCHRAMM, 2006; TONZAR, 2006). É a medida do atrito interno de um fluido. No fluxo laminar, uma camada do fluido se move em relação a uma outra camada que lhe seja adjacente e, assim, sucessivamente, formando um gradiente de velocidades. A esse tipo de fluxo se dá o nome de cisalhamento. Esse movimento de cisalhamento ocorre em resposta à aplicação de uma força mecânica sobre o sistema (GALLEGOS; FRANCO, 1999; TONZAR, 2006).

O tipo de comportamento dos fluidos que apresentam apenas a contribuição viscosa quando ocorre escoamento, foi expresso fisicamente como a **Lei de Newton**, sendo que os fluidos não-Newtonianos têm variações em relação à **Equação 9** (GALLEGOS; FRANCO, 1999; SCHRAMM, 2006; TONZAR, 2006):

$$\boxed{\frac{F}{A} = \eta \cdot \frac{dv}{dx}} \quad \text{ou} \quad \boxed{\eta = \frac{\tau}{\dot{\gamma}}}$$

$$\text{Viscosidade (cP ou mPa.s)} = \frac{\text{Tensão de cisalhamento (mPa ou dina.cm}^2\text{)}}{\text{Taxa de cisalhamento (s}^{-1}\text{)}}$$

Equação 9. Lei de Newton

Onde:

F = força aplicada; **A** = área; **η** = viscosidade e sua unidade pode ser no Sistema CGS, em centiPoise [cP] e no Sistema Internacional, em Pascal.segundo [Pa.s] ou miliPascal.segundo [mPa.s], onde 1cP = 1mPa.s. Um Poise pode ser definido pela força de 1 dina aplicada sobre uma placa, produzindo-se uma velocidade de 1cm.s⁻¹, sendo a distância entre as duas placas de 1 cm e a área das duas placas de 1 cm² cada.

dv = variação da velocidade de deslocamento entre as camadas de um fluido; **dx** = variação da altura da camada molecular que corresponde à distância entre dois planos paralelos; **τ** = tensão de cisalhamento; **γ̇** = taxa de cisalhamento.

O termo **F/A** ou **τ (tensão de cisalhamento)** indica a força aplicada por unidade de área necessária para produzir a ação cisalhante. Sua unidade de medida é uma unidade de **força** por unidade de **área**, no sistema CGS [dina/cm²] e no Sistema Internacional [Pa] ou [N/m²].

A **taxa de cisalhamento (γ̇)** ou **gradiente de velocidade (dv/dx)** ou **deformação por cisalhamento** é uma medida da mudança na velocidade quando as camadas intermediárias de um fluido se movem uma em relação a outra. Em outras palavras, corresponde à variação da velocidade de deslocamento (**dv**) representando a diferença de velocidade entre os dois planos do líquido em função da altura da camada molecular (**dx**) correspondendo à distância entre dois planos paralelos, indicando a taxa com que o líquido escoar, quando uma determinada força é aplicada. A unidade no Sistema Internacional é em 1/segundo (s⁻¹).

2.5 Coletânea resumida da bibliografia consultada

Um resumo dos artigos citados para exemplificar e aprofundar esta revisão da literatura sobre as metodologias analíticas para a avaliação da eficácia fotoprotetora frente à radiação UVA e UVB, com o maior enfoque *in vitro*, estão no **Quadro 5**.

Quadro 5 – Literatura pesquisada quanto às correlações entre as metodologias de medição de eficácia fotoprotetora *in vivo* e *in vitro* (continua)

Referências	Local de realização do estudo	Amostras utilizadas	Metodologia empregada	Conclusão principal
GARCIA <i>et al.</i> , 1991	FCF/USP (Brasil)	Formulações contendo filtros químicos UVB e UVA associados ou não, nas concentrações: mínima, intermediária e máxima (SHAATH, 1990)	Método de Mansur (<i>in vitro</i>)	Formulações que continham filtros químicos UVB diferentes apresentaram valores de FPS muito próximos
SANTOS <i>et al.</i> , 1999	Faculdade de Farmácia da UFRJ (Brasil)	Formulações fotoprotetoras a 2,0; 4,5 e 7,5% de 4-metoxicinamato de 2-etilhexila (loção)	Método de Mansur (<i>in vitro</i>) e metodologia <i>in vivo</i>	Valores obtidos no ensaio <i>in vivo</i> se correlacionaram com resultados do método <i>in vitro</i>
DIFFEY <i>et al.</i> , 2000	Departamento Médico e Físico da área do Hospital de Durham (Reino Unido)	Potencial fotoprotetor de vários filtros solares químicos de 59 formulações comerciais	Avaliação da eficácia UVA pelo método de transmitância difusa com esfera integradora (<i>in vitro</i>): análise do comprimento de onda crítico e razão UVA/UVB	Procedimento <i>in vitro</i> mais empregado na Indústria Cosmética, possui baixo custo e apresenta confiabilidade na medição da proteção solar de amplo espectro dos filtros químicos incorporados
GILLIES <i>et al.</i> , 2003	Hospital Geral de Massachusetts, LFW (Estados Unidos)	Formulações contendo avobenzona e 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona, isoladas, em concentrações de 0 a 5% p/p de cada filtro	Espectroscopia de Reflectância Difusa (DRS), <i>Phototest</i> [®] em humanos e técnica <i>in vitro</i> (aparelho <i>Optometrics</i> [®]) entre 320 a 400 nm	Os dois métodos realizados com voluntários (DRS e <i>Phototest</i>) foram próximos daqueles obtidos com o teste <i>in vitro</i> (aparelho <i>Optometrics</i>)

Quadro 5 – Literatura pesquisada quanto às correlações entre as metodologias de medição de eficácia fotoprotetora *in vivo* e *in vitro* (conclusão)

Referências	Local de realização do estudo	Amostras utilizadas	Metodologia empregada	Conclusão principal
VELASCO <i>et al.</i> , 2008a BABY <i>et al.</i> , 2009	FCF/USP (Brasil)	Formulações contendo rutina, associada ou não a filtros químicos como o 4-metoxicinamato de 2-etilhexila e 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona	Avaliação da eficácia UVA pelo método de transmitância difusa com esfera integradora (<i>in vitro</i>): análise do comprimento de onda crítico e razão UVA/UVB	Formulação com rutina a 0,1% p/p - propriedades fotoprotetoras frente à radiação UVA, comprimento de onda crítico de 385 nm (superior a 370 nm) - adequado na proteção à radiação UVA
VELASCO <i>et al.</i> , 2008b	FCF/USP (Brasil)	Formulações fotoprotetoras contendo rutina, extrato seco de <i>Passiflora incarnata</i> L. e glicólico de <i>Plantago lanceolata</i> , associados ou não com filtros químicos (4-metoxicinamato de 2-etilhexila e 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona) e físico (dióxido de titânio)	Eficácia UVA – método de transmitância difusa com esfera integradora (<i>in vitro</i>): comprimento de onda crítico e razão UVA/UVB	As associações com extratos vegetais interagiram de formas diversas com os filtros químicos e físicos, aumentando ou diminuindo alguns parâmetros por complexo mecanismo fotoquímico

Legenda: USP - Universidade de São Paulo; FCF - Faculdade de Ciências Farmacêuticas; UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro; LFW - Laboratório de Fotomedicina Wellman.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Desenvolvimento e avaliação da estabilidade físico-química e funcional (atividade antirradicalar e eficácia fotoprotetora) em dois diferentes sistemas auto-emulsionados do tipo óleo em água (O/A) contendo succinato de rutina, filtros químicos (4-metoxicinamato de 2-etilhexila e 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona) e físico (dióxido de titânio).

3.2 Específicos

- (a) Desenvolvimento de dois diferentes sistemas auto-emulsionados contendo succinato de rutina a 0,4% p/p associado ou não a filtros químicos (7,5% p/p de 4-metoxicinamato de 2-etilhexila e 3,0% p/p de 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona) e filtro físico (3,0% p/p de dióxido de titânio);
- (b) Realização do Teste de Estabilidade Normal (TEN) das emulsões cosméticas desenvolvidas e análise dos parâmetros organolépticos (aspecto, cor e odor) e físico-químicos (medição de pH e viscosidade);
- (c) Avaliação da atividade antirradicalar das formulações desenvolvidas pelo método de DPPH;
- (d) Avaliação da eficácia fotoprotetora *in vitro* (FPS, comprimento de onda crítico e razão UVA/UVB) das formulações selecionadas empregando a espectrofotometria de reflectância com esfera de integração;
- (e) Caracterização reológica das formulações selecionadas (viscosidade aparente, curva de fluxo e área de histerese);
- (f) Escolha das formulações quanto ao sensorial, espalhabilidade, melhor atividade antirradicalar, eficácia fotoprotetora e caracterização reológica.

4 METODOLOGIA

4.1 Material

4.1.1 Princípio ativo (Grau de pureza farmacêutico)

- ✓ *Rutin Succinate* (Succinato de rutina, teor de pureza 85%): obtido por síntese química, FCF/USP

4.1.2 Reagentes (Grau de pureza analítico)

- ✓ Álcool etílico absoluto: Labsynth, Brasil
- ✓ *Ammonium acryloyldimethyl-taurate / VP copolymer (and) rapeseed oil sorbitol esters (and) trilaureth-4 phosphate (and) mineral oil (and) isopropyl palmitate* (Hostacerin[®]SAF, Lote BRAC041521042003): Clariant, Suíça
- ✓ *Benzophenone-3* (Uvinul[®]M 40, Lote AUTO065363): Daltomare Química, Brasil
- ✓ *Butylhydroxitoluene* (BHT, Lote 72000082001): Natural Pharma, Brasil
- ✓ *Caprylic/capric triglyceride* (Crodamol[®]GTCC, Lote L717954): Croda, Estados Unidos
- ✓ *Cetearyl alcohol (and) dicetyl phosphate (and) ceteth-10 phosphate* (Crodafos[®]CES, Lote 0376142): Croda, Estados Unidos
- ✓ *Cetearyl alcohol (and) polysorbate 60 (and) cetearyl glucoside (and) stearyl alcohol* (Uniox[®]C, Lote CHN 02960900): Chemyunion, Brasil
- ✓ *Citric acid* (Ácido cítrico, Lote 098768): Labsynth, Brasil
- ✓ *Cyclopentasiloxane* (DC[®]245, Lote 00164803008112001): Dow Corning, Estados Unidos
- ✓ *Dimethicone (and) trimethylsiloxysilicate* (DC[®]593, Lote 0005370560): Dow Corning, Estados Unidos
- ✓ *1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical* (DPPH, Lote D9132-5G): Sigma-Aldrich, Estados Unidos
- ✓ *Dissodium EDTA* (EDTA Na₂, Lote 20030220122006): Natural Pharma, Brasil
- ✓ Essência para incorporação nas bases cosméticas Vanart[®]: Givaudan, Estados Unidos
- ✓ *Ethylhexyl methoxycinnamate* (Uvinul[®] MC80, Lote 01/699122003): Daltomare Química, Brasil

- ✓ *6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid* (Trolox[®]): Sigma-Aldrich, Estados Unidos
- ✓ *Phenoxyethanol (and) methylparaben (and) butylparaben (and) ethylparaben (and) propylparaben (and) isobutylparaben* (Phenoben[®], Lote CH230696061997): Chemyunion, Brasil
- ✓ *Propylene glycol* (Lote M0792/10): Alpha Química, Brasil
- ✓ *Sodium polyacrylate (and) dimethicone (and) cyclopentasiloxane (and) trideceth-6 (and) PEG/PPG-18/18 dimethicone* (DC[®]2051, Lote A15/1293): Dow Corning, Estados Unidos
- ✓ *Titanium dioxide (and) manganese oxide* (Optisol[®], Lote OX408): Croda, Estados Unidos
- ✓ *Triethanolamine* (Lote 054681052009): Mapric, Brasil
- ✓ *Vinyl dimethicone crosspolymer (and) C12-14 pareth-12* (DC[®]9509, Lote 0001877150): Dow Corning, Estados Unidos

4.1.3 Equipamentos e acessórios

- ✓ Agitador magnético 713D: Fisatom[®], Brasil
- ✓ Balança analítica 205A SCS com precisão de 0,0001g: Precisa[®], Inglaterra
- ✓ Balança Semi-Analítica LC1: Marte[®], Brasil
- ✓ Balança Semi-Analítica BG4000[®]: Gehaka[®], Brasil
- ✓ Banho-maria termostatzado digital, com agitação e graduação de temperatura entre 0 a 80°C 500/3D[®]: Nova Ética[®], Brasil
- ✓ Banho Ultrassônico USC1600A[®]: Unique[®], Brasil
- ✓ Câmara Climática 420/CLD[®] 300, com graduação de temperatura de 20 à 60°C e de umidade relativa (UR) de 20 à 90%: Nova Ética[®], Brasil
- ✓ Centrífuga refrigerada CR20-B2: Hitachi[®], Japão
- ✓ Centrífuga RC5C[®] Sorvall: Dupont Instruments[®], Estados Unidos
- ✓ Chapa Aquecedora Redonda Plataforma Q310-22B[®]: Quimis[®], Brasil
- ✓ Espectrofotômetro TCC – 240A UV-Vis, com cubeta de quartzo com 1 cm de caminho óptico: Shimadzu[®], Japão
- ✓ Espectrofotômetro 50 UV-Vis Varian[®], com cubeta de quartzo com 1 cm de caminho óptico: Vankel[®], Austrália

- ✓ Espectrofotometria de reflectância com esfera de integração UV Transmittance Analyzer[®]: Labsphere[®], USA
- ✓ Estufa para secagem e esterilização MA033: Marconi[®], Brasil
- ✓ Freezer200[®] Slim: Cònsul[®], Brasil
- ✓ Homogeneizador/dispersor *Ultra Turrax* DI 25[®], com controle de velocidade variável entre 8.000 a 24.000 rpm: IKA[®], China
- ✓ Peagômetro Q400AS: Quimis[®], Brasil
- ✓ Pipeta 5-50µL; 20-200µL; 100-1000µL: Eppendorf[®], Alemanha
- ✓ Pipeta High Precision Micropipette[®] 20-200uL e 5-50uL: Digipet[®], Estados Unidos
- ✓ Placas de INERT PMMA (Polimetil-metacrilato) Helioplate HD6 n° 11 (5cm x 5cm): HelioScreen Labs[®], França
- ✓ Programa Statistica 7.0: StatSoft Inc[®]. South América, Estados Unidos
- ✓ Programa Cary Win UV 2.0: Simple Reads Application Software, Vankel[®], Austrália
- ✓ Programa BioEstat 5.0[®]: Wildlife Conservation Society, Estados Unidos
- ✓ Programa UV-2000 Application 1.1.1.0[®]: Labsphere, Estados Unidos
- ✓ Programa RHEOPLUS/32 3.40: Anton Paar, Alemanha
- ✓ Refrigerador Ecoplus 370: Bosch, Brasil
- ✓ Reômetro Physica[®] MCR 300 (Anton Paar) usando tipo placa-placa PP-50 com diâmetro 49,99 mm: Paar Physica, Alemanha
- ✓ Seringa Hipodérmica de Uso Único Insulina U-100[®]: Saldanha Rodrigues, Brasil
- ✓ Viscosímetro Visco Star-R[®], com adaptador para avaliação de amostras de massa reduzida e agulhas TR10 e TR11: Fungilab[®], Espanha

4.2 Métodos

4.2.1 Preparo das formulações fotoprotetoras

Após a seleção criteriosa das formulações fotoprotetoras realizada no **Capítulo 2** por meio da Avaliação Preliminar da Estabilidade (APE) e Teste de Estabilidade Acelerada (TEA), as formulações contendo succinato de rutina (associada ou não aos filtros solares), incorporadas em dois sistemas emulsionados O/A distintos (**Tabela 1A** - Crodafo[®]CES e Uniox[®]C e **1B** - Hostacerin[®]SAF), foram escolhidas para a continuidade do Teste da

Estabilidade Normal (TEN). O estudo foi realizado em duplicata de acordo com as seguintes associações:

- ✓ (S) → succinato de rutina a 0,4% (p/p);
- ✓ (M) → 4-metoxicinamato de 2-etilhexila a 7,5% (p/p) + 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona 3% (p/p) + dióxido de titânio a 3% (p/p);
- ✓ (MS) → 4-metoxicinamato de 2-etilhexila a 7,5% (p/p) + 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona a 3% (p/p) + dióxido de titânio a 3% (p/p) + succinato de rutina a 0,4% (p/p).
- ✓ As matérias-primas que foram utilizadas na elaboração dos sistemas fotoprotetores O/A estão relacionadas na **Tabela 1** acompanhadas de sua Nomenclatura Internacional dos Ingredientes Cosméticos (INCI), com suas respectivas funções e concentrações (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2006; EUROPEAN COMMISSION HEALTH AND CONSUMERS, 2009), sob a seguinte técnica de preparação:

- ◆ Pesaram-se os componentes da fase aquosa (**Fase 1**) e aqueceu-se até a temperatura de 60,0-65,0°C. Quando a succinato de rutina foi adicionada às formulações **S** e **MS**, houve o acerto de pH para 8,0 com trietanolamina até a solubilização;
- ◆ Pesaram-se os componentes da fase oleosa (**Fase 2**) e aqueceu-se até a temperatura de 60,0-65,0°C, exceto para as formulações **SB**, **MB** e **MSB** (Hostacerin® SAF) foram emulsionadas a frio, misturando-as diretamente com a fase aquosa (**Fase 1**);
- ◆ Verteu-se a **Fase 2** em **1** sob forma lenta e constante em béquer, com auxílio do agitador mecânico (800 rpm) até homogeneização da emulsão;
- ◆ Esperou-se a emulsão esfriar, sob agitação manual até a temperatura de 45,0-50,0°C. Houve a adição da mistura de silicones (**Fase 3**) com o auxílio do agitador mecânico (1500 rpm);
- ◆ Após a homogeneização da emulsão + silicones, adicionou-se a **Fase 4** previamente dispersada (dióxido de titânio + triglicerídeos do ácido cáprico/caprílico + DC®593) sob agitação mecânica a 1500 rpm, exceto para a formulação **S**;
- ◆ Após a homogeneização completa da emulsão, misturou-se o conservante (**Fase 5**);
- ◆ Verificou-se o pH e, se necessário, foi ajustado para pH 6,0-6,5 (**Fase 6**) e houve a incorporação da essência Vanart® em todas as preparações.

As formulações (**S**, **M** e **MS** subdivididas em **A** e **B**) permaneceram 24 horas em repouso para finalização do processo de emulsificação (AGÊNCIA NACIONAL DE

VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004; PRISTA *et al.*, 1995; SCHUELLER; ROMANOWSKI, 2002) e início do estudo de estabilidade normal.

Tabela 1 – Descrição quali- e quantitativa utilizadas na produção de formulações fotoprotetoras O/A (óleo em água) utilizando em **A** (Crodafo[®] CES e Uniox[®] C) e **B** (Hostacerin[®] SAF) incorporando o succinato de rutina durante o Teste de Estabilidade Normal (TEN)

Componentes		Nomenclatura INCI		S		M		MS	
				A	B	A	B	A	B
Fase 1				% p/p					
Água destilada q.s.p.	Aqua			100,0		100,0		100,0	
EDTA Na ₂	Dissodium EDTA			0,2		0,2		0,2	
Propilenoglicol	Propylene glycol			3,0		3,0		3,0	
Succinato de Rutina	Rutin succinate			0,4		-		0,4	
Fase 2									
BHT	BHT			0,2		0,2		0,2	
Crodafos® CES	Cetearyl alcohol (and) dicetyl phosphate (and) ceteth-10 phosphate	5,0	-			5,0	-	5,0	-
Uniox® C	Cetearyl alcohol (and) polysorbate 60 (and) cetearyl glucoside (and) stearyl alcohol	3,0	-			3,0	-	3,0	-
2-hidroxi-4-metoxibenzofenona (UVA)	Benzophenone-3			-		3,0		3,0	
4-metoxicinamato de 2-etilhexila (UVB)	Ethylhexyl methoxycinnamate			-		7,5		7,5	
Hostacerin® SAF	Ammonium acryloyldimethyl-taurate/ VP copolymer (and) rapeseed oil sorbitol esters (and) trilaureth-4 phosphate (and) mineral oil (and) isopropyl palmitate	-	3,0			-	3,0	-	3,0
Fase 3									
DC®9509	Vinyl dimethicone crosspolymer (and) C12-14 pareth-12			1,0		1,0		1,0	
DC®245	Cyclopentasiloxane			1,0		1,0		1,0	
DC®2051	Sodium polyacrylate (and) dimethicone (and) cyclopentasiloxane (and) trideceth-6 (and) PEG-PPG-18/18 dimethicone			1,0		1,0		1,0	
Fase 4									
Triglicérides do ácido cáprico/caprílico	Caprylic/capric triglyceride			3,0		3,0		3,0	
DC®593	Dimethicone (and) trimethylsiloxysilicate			2,0		2,0		2,0	
Dióxido de Titânio (Optisol® - filtro físico)	Titanium dioxide (and) manganese oxide			-		3,0		3,0	
Fase 5									
Phenoben®	Phenoxyethanol (and) methylparaben (and) butylparaben (and) ethylparaben (and) propylparaben (and) isobutylparaben			0,5		0,5		0,5	
Fase 6									
Trietanolamina ou ácido cítrico a 20% q.s.	Triethanolamine			pH 6,0-6,5		pH 6,0-6,5		pH 6,0-6,5	
Essência Vanart® - Givaudan	Fragrance			0,2		0,2		0,2	

4.2.2 Teste de Estabilidade Normal (TEN)

O estudo de estabilidade fornece indicações sobre o comportamento do produto, em determinado intervalo de tempo, frente às condições ambientais a que possa ser submetido, desde a fabricação até o término da validade, contribuindo para orientar o desenvolvimento da formulação e do material de acondicionamento adequado; fornecer subsídios para o aperfeiçoamento das formulações e estimar o prazo de validade. Neste estudo, diversos aspectos podem ser analisados em um produto cosmético, como: químico (teor do princípio ativo), físico (aparência, cor, odor, consistência, espalhabilidade e comportamento reológico), microbiológico (contagem microbiológica, presença de patogênicos e teste de eficácia de conservantes) e funcional (atividade antioxidante/antirradicalar e eficácia fotoprotetora), que devem ser mantidos inalterados ou com pequenas modificações que não comprometam o uso e a ação fotoprotetora do produto (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004; BABY *et al.*, 2004).

As seis formulações foram preparadas em duplicata e submetidas ao Teste de Estabilidade Normal (TEN) em três condições de temperatura e umidade diversas, após o período de repouso de 24 horas (início do teste, dia 0 ou t_0), a fim de se completar o processo de emulsificação (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004). Foram pesados cerca de 25 g das formulações-testes e acondicionadas em embalagens de polietileno brancas e leitosas de boca larga com tampa do tipo rosca e batoque, adequadamente vedadas e capacidade de 30 g. As amostras armazenadas em temperatura ambiente ao abrigo da luz e umidade ($22,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$) foram consideradas como amostras padrão para este estudo, cujas características organolépticas, físicas, físico-químicas e químicas sofrem alterações desprezíveis ou reduzidas (BABY *et al.*, 2004) e as análises foram realizadas a esta mesma temperatura ambiente. A seguir, estão descritas as condições adotadas, os dias pré-estabelecidos para as análises e as inscrições feitas nas formulações-teste como descrito a seguir (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004; BABY *et al.*, 2004; RIBEIRO *et al.*, 1996):

(a) t_0 (tempo) → análises 24 horas após o preparo das seis formulações à temperatura ambiente ($22,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$) (**S1, S2, M1, M2, MS1 e MS2**);

(b) t_{15} , t_{30} , t_{60} e t_{90} → análises nos tempos (15, 30, 60 e 90 dias) →

- 6 formulações-teste submetidas à temperatura de $45,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ e 75% de umidade relativa- UR (**estufa**) (**ES1, ES2, EM1, EM2, EMS1 e EMS2**);

- 6 formulações-teste submetidas à temperatura de $25,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ sob luz solar indireta e com influência da radiação UV (**ambiente**) (**TAS1, TAS2, TAM1, TAM2, TAMS1 e TAMS2**);

- 6 formulações-teste submetidas à temperatura de $5,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ (**geladeira**) (**GS1, GS2, GM1, GM2, GMS1 e GMS2**).

Nas condições de baixas temperaturas como em refrigerador ($5,0^{\circ}\text{C}$) pode ocorrer a separação de fase das emulsões, devido a temperatura próxima ao congelamento da fase aquosa ou mesmo acelerar a precipitação de princípios ativos. Na estufa ($45,0^{\circ}\text{C}$), os processos físico-químicos e as velocidades de reação aumentam com a temperatura, afetando sua viscosidade, solubilidade dos componentes e o coeficiente de partição entre as fases. A temperatura ambiente ($25,0^{\circ}\text{C}$) retrata a condição mais provável de armazenamento do produto durante o período de comercialização (RIBEIRO *et al.*, 1996).

4.2.3 Parâmetros e critérios adotados nas avaliações de estabilidade

Os parâmetros a serem avaliados devem ser definidos pelo formulador e dependem das características do produto e dos ingredientes utilizados na formulação e envolvem as possíveis alterações físicas e físico-químicas, quanto aos parâmetros organolépticos [aspecto, cor, odor] e parâmetros físico-químicos e funcionais [valor de pH, de viscosidade aparente, de área de histerese, de Fator de Proteção Solar *in vitro* (FPS), de razão UVA/UVB, de comprimento de onda crítico (λ_c) e de atividade antirradicalar]. As análises foram realizadas à temperatura ambiente ($22,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$) (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004; BABY *et al.*, 2004).

O estudo da estabilidade pelo TEN é orientativo e teve como objetivo a previsão da estabilidade das formulações-teste em um período médio de 90 dias, mantendo as formulações armazenadas em, no mínimo, três condições distintas de temperatura, umidade e luminosidade. Os resultados obtidos pela TEN, após interpretação e tratamento estatístico pertinente, são extrapolados, permitindo gerar informações sobre a vida útil do produto, teoricamente, que será confirmado acompanhando o produto durante todo o prazo de validade (*shelf life*). Os critérios adotados para a aprovação ou rejeição das amostras avaliadas (TEN) foram (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004; BABY *et al.*, 2004; ISAAC *et al.*, 2008; PINTO, 2003):

→ **Aspecto:** integridade das amostras mantendo o aspecto inicial nas condições de armazenamento, classificada como **Normal (N)**, exceto em temperaturas elevadas em que leves modificações (**LM**) foram aceitas;

→ **Cor e odor:** normais (**N**) durante o armazenamento à luz solar indireta à temperatura ambiente e leves modificações (**LM**) foram aceitas em temperaturas elevadas;

→ **Valor de pH:** a aceitação da variação percentual foi $\pm 5\%$;

→ **Valor de viscosidade aparente:** a aceitação da variação percentual foi $\pm 20\%$;

→ **Valor de área de histerese:** a aceitação da variação percentual foi $\pm 25\%$;

→ **Valor de FPS:** a aceitação da variação percentual foi $\pm 20\%$ e para o coeficiente de variação obtido no equipamento pela leitura de 9 pontos diferentes na placa foi $\pm 20\%$;

→ **Valor de comprimento de onda crítico (λ_c):** a aceitação da variação percentual foi $\pm 5\%$;

→ **Valor de razão UVA/UVB:** a aceitação da variação percentual foi $\pm 20\%$;

→ **Valor de atividade antirradicalar:** não foi feita a análise de variação percentual.

A análise de variação percentual dos valores acima foi realizada comparando as formulações entre si no tempo zero (t_0) e após 90 dias (t_{90}), exceto para o valor de atividade antirradicalar. O critério destes números foi determinado após uma primeira caracterização dos sistemas emulsionados por meios dos diversos ensaios realizados durante o Teste de Estabilidade Acelerada (ISAAC *et al.*, 2008).

4.2.3.1 Tratamento estatístico

O critério de inclusão e exclusão foi complementado pela análise estatística dos dados acima relacionados.

Para as análises que se seguem, foram consideradas as seguintes variáveis: 5 tempos (t_0 , t_{15} , t_{30} , t_{60} e t_{90}), 3 amostras (**S**, **M** e **MS**) e 3 condições (temperatura ambiente, geladeira e estufa), sendo que foram considerados nove comportamentos diferentes de formulações durante 90 dias do teste de estabilidade.

Os resultados foram analisados estatisticamente por meio do *software* Statistica® 7.0 (Stat SoftTM, Tulsa, Okla., USA). Inicialmente, as variâncias dos tratamentos foram avaliadas quanto à sua homogeneidade pelo teste de Hartley ($\alpha = 0,05$) (GRANATO *et al.*, 2010).

Os resultados obtidos da viscosidade aparente, da área de histerese, do FPS, do comprimento de onda crítico, da razão UVA/UVB e da atividade antirradicalar foram analisados

por meio do teste paramétrico, sendo as médias dos tratamentos testadas por meio da análise de variância univariada (*one-way* ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Fisher LSD a 5% de probabilidade (GRANATO *et al.*, 2010). Estas análises foram feitas comparando-se os dados de uma mesma linha da tabela levando em consideração a amostra e a condição a que foram submetidas às amostras no decorrer dos 90 dias de análise.

Os resultados também foram analisados utilizando o programa BioEstat 5.0[®] (Wildlife, USA) e as médias dos tratamentos testadas por meio da análise de variância multivariada (ANOVA fatorial *a b c*) considerando as variáveis (A) amostras **S**, **M** e **MS** nas (B) 3 condições (geladeira, estufa e temperatura ambiente) e nos (C) tempos (0, 15, 30, 60 e 90 dias). Foi calculado o valor de Fisher (F), que mostra a força das interações entre as variáveis (A, B e C) sendo este valor diretamente proporcional à força da interação.

4.2.3.2 Parâmetros organolépticos

A avaliação destes parâmetros ocorre por meio dos órgãos dos sentidos macroscopicamente – **avaliação visual** (aspecto e cor) e **olfativa** (odor), com o objetivo de verificar alterações como separação de fases, precipitação, homogeneidade, brilho e ausência ou presença de grumos possibilitando o reconhecimento primário do produto (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2008). Estas avaliações foram realizadas por meio de análises comparativas com uma formulação padrão, armazenada em temperatura ambiente ao abrigo da luz e umidade ($22,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$) (BABY *et al.*, 2004).

A classificação foi feita da seguinte forma (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004; BABY *et al.*, 2004):

(**M**) modificada;

(**LM**) levemente modificada;

(**N**) normal, sem alteração quanto ao aspecto, cor e odor.

4.2.3.3 Parâmetros físico-químicos e funcionais das formulações fotoprotetoras

São importantes para pesquisar alterações na estrutura da formulação que não podem ser detectadas visualmente e podem indicar problemas de estabilidade entre os ingredientes ou decorrentes do processo de fabricação (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004).

a) Determinação do pH

A determinação do pH é realizada pela diferença de potencial entre dois eletrodos (referência e medida) imersos na amostra a ser analisada, e a acidez ou alcalinidade da amostra resulta da atividade dos íons de hidrogênio na solução (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2008).

Houve a calibração do peagômetro com as soluções padrão (pH 7 e pH 4). Depois foram preparadas as dispersões a 10% p/v das formulações em réplicas de três, homogeneizadas e analisadas quanto ao valor de pH em água recém-destillada, à temperatura ambiente ($22,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$) (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2008; BABY *et al.*, 2004).

b) Determinação do perfil reológico

O equipamento utilizado para medir as propriedades viscosas e elásticas de fluidos, de sólidos e de semi-sólidos é chamado de reômetro, enquanto outro equipamento comumente utilizado, o viscosímetro, é limitado apenas à medida de viscosidade (GALLEGOS; FRANCO, 1999; SCHRAMM, 1998; TONZAR, 2006).

As análises reológicas foram realizadas após 24 horas do preparo das formulações, sendo o comportamento reológico obtido por meio da determinação da viscosidade aparente, curva de fluxo e área de histerese.

O método utilizado para se determinar a viscosidade das formulações **B** (Hostacerin[®] SAF), em duplicata, empregou o viscosímetro rotativo que consiste na medição do torque requerido para rodar um fuso imerso em um dado fluido. Para esta medição utilizou-se o viscosímetro Viscostar-R-Marte[®], spindle TR10 a 100 rpm e temperatura da amostra de $22,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2008).

Além da medição da viscosidade, foi realizada a curva de fluxo e área de histerese para as formulações **A** (Crodafos[®] CES e Uniox[®] C) em reômetro Paar Physica MCR-300, equipado com geometria do tipo placa-placa (diâmetro placa 49,99 mm) e velocidades variando de 0,1 a $200,0 \text{ s}^{-1}$. Para a determinação da curva de fluxo, foram coletados na curva ascendente 60 pontos a 5 segundos por ponto, seguiu-se um intervalo de 5 pontos a 5 segundos cada, a uma taxa de cisalhamento constante de $200,0 \text{ s}^{-1}$ e, finalmente, iniciou-se a curva descendente em que se registraram 60 pontos a 5 segundos por ponto. Os valores de viscosidade aparente foram analisados na taxa de cisalhamento ($200,0 \text{ s}^{-1}$) em razão do fato de que esse valor de taxa

aproxima a condição de espalhamento tópico das formulações cosméticas (BARRY, 1993; FIGUEIREDO *et al.*, 2008).

As formulações A foram transferidas para a placa de medição protegida por aparato de acrílico com o objetivo de reduzir a evaporação excessiva da fase aquosa das preparações. Foram utilizadas amostras de aproximadamente 0,5 g da formulação. Anteriormente às medições, o sistema permaneceu em repouso durante até 2 minutos para atingir a temperatura de medição de $22,00 \pm 0,01^{\circ}\text{C}$, obtida por meio da placa Peltier (TEK 150P-C) (LASHMAR; BEESLEY, 1993; TADROS, 2004).

Este estudo colaborativo, incluindo o uso do reômetro e a análise dos dados reológicos, foi realizado no Instituto de Química - Departamento de Química Fundamental (Profa. Dra. Elizabeth Pinheiro Gomes Arêas).

c) Atividade antirradicalar pelo método de DPPH[•] (2,2-difenil-1-picriidrazila)

O método de Brand-Williams, Bondet e Berset (1997) baseia-se na redução do radical 2,2-difenil-1-picriidrazila (DPPH[•]) em solução de metanol ou etanol, o qual apresenta um máximo de absorção a 515-528 nm. Ao fixar um H[•], abstraído ao antioxidante em estudo, observa-se uma diminuição na absorbância, o que permite calcular, após o estabelecimento do equilíbrio da reação, a quantidade de antioxidante consumida para reduzir 50% do DPPH[•]. Para o presente estudo foi usada esta metodologia modificada por Sanchez-Moreno *et al.* 1998.

As formulações fotoprotetoras foram avaliadas quanto à atividade antirradicalar pelo método espectrofotométrico utilizando este radical estável descrito, sendo pesadas e dispersas em álcool etílico P.A., visando obter misturas de concentração aproximadamente de 20 mg/mL (1:50). Então foram centrifugadas a 3000 rpm durante 15 minutos. Foi adicionada uma alíquota de 0,5 mL do sobrenadante em 2,5 mL de DPPH[•] (100 μM ou 39,4 $\mu\text{g/mL}$), vigorosamente agitada manualmente e incubada ao abrigo da luz por 30 minutos, à temperatura ambiente ($22,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$). Após este período, a redução do radical livre DPPH[•] foi mensurada pela leitura da absorbância em espectrofotômetro UV-VIS no comprimento de onda 517 nm, sendo o teste feito em duplicata.

O controle negativo foi realizado com 2,5 mL de DPPH[•] (100 μM) e 0,5 mL de álcool etílico P.A. Utilizou-se álcool etílico P.A. como branco de leitura.

Neste teste é possível visualizar a amostra onde ocorre o sequestro do radical livre porque torna-se amarela, enquanto na amostra que não reage ao DPPH[•] permanece com a cor lilás.

Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição do radical DPPH[•] de acordo com a **Equação 10** (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1997; SÁNCHEZ-MORENO *et al.*, 1998):

$$\% \text{ de inibição do DPPH}^{\bullet} = \frac{(\text{Absorbância do controle negativo} - \text{Absorbância da amostra}) \times 100}{\text{Absorbância do controle negativo}}$$

Equação 10. Cálculo da porcentagem de inibição do radical DPPH[•] (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1997)

d) Eficácia fotoprotetora *in vitro*

A eficácia fotoprotetora *in vitro* das formulações cosméticas foi avaliada utilizando-se a espectrofotometria de reflectância com esfera de integração, método que se baseia na correlação entre a energia de reflectância difusa e os coeficientes de absorção e dispersão da amostra (SPRINGSTEEN *et al.*, 1999).

As formulações-testes foram aspiradas em seringa descartável e pesadas em 2 mg/cm² (50,0 ± 3,0 mg), descontando o peso inicial da seringa vazia. A aplicação destas foi realizada em forma de filme uniforme no lado rugoso da placa de polimetilmetacrilato de 25 cm² (PMMA), com o uso do dedo protegido por uma dedeira de látex pré-saturada com a própria formulação, num movimento circular (vertical e horizontal) com uma mesma pressão por 30 segundos. Após isto, as placas foram guardadas para secar num lugar seco a temperatura controlada de 22,0 ± 1,0°C por 15 minutos. Imediatamente a este período, a absorbância do filme formado foi medida usando o equipamento (Labsphere® UV2000S *Ultraviolet Transmittance Analyzer*) que emitiu luz no intervalo espectral de 290 a 400 nm sobre nove pontos da placa e, após a passagem da radiação pelo filme da amostra e captação da luz dispersa por uma esfera integradora, foi obtida a transmitância hemisférica total, que indica o quanto da luz incidida conseguiu atravessar a amostra (EUROPEAN COSMETICS ASSOCIATION, 2007; SPRINGSTEEN *et al.*, 1999).

Os resultados foram obtidos em forma de curvas de transmitância *versus* comprimento de onda e o programa fornece, através da média das 9 medidas de transmissão monocromática, os valores de FPS, $\lambda_{\text{crítico}}$ e razão UVA/UVB. Foi necessária a utilização de uma placa intacta de PMMA como referência (branco), representando 100% de transmissão, antes da leitura das amostras (EUROPEAN COSMETICS ASSOCIATION, 2007; SPRINGSTEEN *et al.*, 1999).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Desenvolvimento de formulações fotoprotetoras

A eficácia de um fotoprotetor está intimamente relacionada aos componentes presentes na formulação cosmética, os quais podem influenciar sinérgica ou negativamente no produto final, aumentando ou diminuindo o Fator de Proteção Solar (FPS). Uma seleção criteriosa das matérias-primas empregadas na formulação do produto é imprescindível, pois muitas de suas características como: espalhabilidade, resistência à água, espessura do filme, uniformidade, opacidade e substantividade são delas decorrentes. Uma maior atenção deve ser dada aos emolientes, emulsionantes e a escolha dos veículos utilizados que, de acordo com sua natureza química ou física, podem doar características diferenciadas aos produtos. Isto implica, dizer que a preocupação não deve estar somente voltada às concentrações dos filtros físicos e químicos incorporados às formulações, mas também, aos tipos de bases cosméticas utilizadas e à estabilidade das associações aos filtros solares, como os antioxidantes (MILESI; GUTERRES, 2002; ISAAC *et al.*, 2008).

Outra preocupação neste **Capítulo** foi com a continuidade dos estudos de estabilidade de maior duração num período de 90 dias, utilizando metodologias alternativas *in vitro* e objetivando menor tempo de análise, facilidade na obtenção de resposta, menor custo e respostas úteis na escolha das preparações que servirão de base para o estudo com voluntários em trabalhos futuros ou, mesmo, o lançamento no mercado cosmético visando oferecer um produto de eficácia fotoprotetora comprovada (valor de FPS, comprimento de onda crítico e razão UVA/UVB). Este ensaio foi complementado pela avaliação da influência antirradicalar do succinato de rutina (a 0,4% p/p) (PEDRIALI *et al.*, 2008) associado aos filtros 4-metoxicinamato de 2-etilhexila a 7,5% p/p (UVB), 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona a 3,0% p/p (UVA) e dióxido de titânio a 3,0% p/p (físico) incorporado em dois sistemas emulsionados aniônicos O/A distintos, como segue: **(A)** cera a base de emulsionante fosfatado (Crodafos[®]CES) e co-emulsionante não-iônico estabilizante de emulsão (Uniox[®]C) e **(B)** com emulsionante vegetal baseado em óleo de canola e com éster emoliente fosfórico (Hostacerin[®]SAF). Por último, a influência destas bases cosméticas autoemulsionáveis diferentes na eficácia fotoprotetora foi medida pela análise do perfil reológico (viscosidade aparente, curva de fluxo, área de histerese, tixotropia).

5.2 Parâmetros organolépticos

As características organolépticas determinam os parâmetros de aceitação do produto pelo consumidor, ou seja, essas análises têm como objetivo garantir que possíveis alterações que possam ocorrer no produto não serão perceptíveis pelos sentidos e não trarão qualquer perda de benefício ou segurança do produto (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004). Os resultados obtidos referentes aos parâmetros organolépticos foram descritos na **Tabela 2**.

Analizando os dados obtidos quanto ao aspecto, foi verificado que todas as formulações **S**, **M** e **MS** (em ambas as bases cosméticas **A** e **B**) permaneceram inalteradas durante o período de 90 dias não apresentando separação de fases ou a presença de precipitados.

Quanto ao parâmetro cor (clareamento) e odor (atenuação), as modificações foram leves e começaram a ocorrer a partir do período de 60 dias e, em maior proporção nas três condições de análise: geladeira ($5,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$), estufa ($45,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$) e temperatura ambiente ($25,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$) para a formulação **M**, predominando a diminuição da intensidade da cor salmão clara (Crodafos[®]CES + Uniox[®]C) e a diminuição da intensidade da cor bege alaranjada clara (Hostacerin[®]SAF). Dessa forma, com estes resultados, observou-se que a radiação ultravioleta presente na luz solar, temperatura e umidade, tiveram influência na aceleração das mudanças de coloração e odor da formulação **M** (**Tabela 2**).

Comparativamente, as amostras **S** e **MS** sofreram menor impacto sobre a alteração do parâmetro cor e odor nas condições analisadas (**Tabela 2**).

As formulações **S** e **MS** tiveram diminuição da cor e atenuação do odor a partir de 60 dias de armazenamento na condição refrigeração ($5,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$), quando incorporadas à base cosmética Crodafos[®]CES + Uniox[®]C. Contudo, apresentaram um escurecimento (**S**) e diminuição (**MS**) da cor, seguidos por atenuação do odor a partir de 60 dias de armazenamento na condição estufa ($45,0 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$), quando incorporada à base cosmética Hostacerin[®]SAF. Para a base cosmética Crodafos[®]CES + Uniox[®]C, o maior impacto de modificação foi o armazenamento em baixas temperaturas, porém a base cosmética Hostacerin[®]SAF teve maior impacto com o aumento de temperatura e da umidade.

Estas alterações são resultantes de processos de desestabilização e são de grande importância para a avaliação da estabilidade organoléptica do produto. Conforme recomendações da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2004), apenas pequenas alterações seriam aceitáveis em condições críticas de exposição. Estes resultados estão satisfatórios com a legislação pertinente, pois ambas as formulações em temperatura ambiente com exposição à luz

solar direta se mantiveram estáveis durante o período de estudo, uma vez que esta condição estaria muito próxima à condição de armazenamento do produto pelo consumidor usuário de um produto fotoprotetor.

Tabela 2 – Avaliação dos parâmetros organolépticos (aspecto, cor e odor) das formulações fotoprotetoras desenvolvidas com as bases cosméticas **A** (Crodafos[®] CES + Uniox[®] C) e **B** (Hostacerin[®] SAF) durante o Teste de Estabilidade Normal (TEN)

A						
tempo (dias)		t0	t15	T30	t60	t90
Formulação	Condição	cor, odor e aspecto				
S	G	Cor amarela esbranquiçada, odor característico e aspecto homogêneo	N	N	LM ^b	LM ^b
	E		N	N	N	N
	TA		N	N	N	N
M	G	Cor salmão clara, odor característico e aspecto homogêneo	N	N	LM ^b	LM ^b
	E		N	N	LM ^b	LM ^b
	TA		N	N	LM ^b	LM ^b
MS	G	Cor salmão, odor característico e aspecto homogêneo	N	N	LM ^b	LM ^b
	E		N	N	N	N
	TA		N	N	N	N

B						
S	G	Cor amarela clara, odor característico e aspecto homogêneo	N	N	N	N
	E		N	N	LM ^a	LM ^a
	TA		N	N	N	N
M	G	Cor bege alaranjada clara, odor característico e aspecto homogêneo	N	N	LM ^b	LM ^b
	E		N	N	LM ^b	LM ^b
	TA		N	N	LM ^b	LM ^b
MS	G	Cor bege alaranjada clara, odor característico e aspecto homogêneo	N	N	N	N
	E		N	N	LM ^b	LM ^b
	TA		N	N	N	N

Legenda: t₀: tempo inicial das leituras (24 horas após o preparo); t15, 30, 60 e 90 = após 15, 30, 60 e 90 dias de armazenamento; **N**: Normal, sem alterações; **LM**: levemente modificado; **LM^a**: coloração mais escura e odor mais atenuado que a t₀; **LM^b**: coloração mais clara e odor mais atenuado que a t₀; **G** – Geladeira (5,0 ± 0,5°C); **E** – Estufa (45,0 ± 0,5°C e 75% de umidade relativa); **TA** - Temperatura ambiente (25,0 ± 2,0°C, sob luz indireta); (**S**) 0,4% (p/p) de succinato de rutina; (**M**) 7,5% (p/p) de 4-metoxycinamato de 2-etilhexila + 3,0% (p/p) de 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona + 3,0% (p/p) de dióxido de titânio; (**MS**) 7,5% (p/p) de 4-metoxycinamato de 2-etilhexila + 3,0% (p/p) de 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona + 3,0% (p/p) de dióxido de titânio + 0,4% (p/p) de succinato de rutina.

A avaliação organoléptica envolve a média de duas leituras e foi realizada pelo mesmo analista durante todo o estudo.

5.3 Determinação do pH

A determinação do pH é importante para avaliar alterações na estrutura da formulação que nem sempre são perceptíveis sensorialmente (análises organolépticas). O acompanhamento dos valores de pH durante o estudo de estabilidade fornece informações a respeito de possíveis alterações químicas da formulação, ou seja, decréscimos desses valores podem estar relacionados à oxidação da fase oleosa com a formação de cadeias oxidadas, hidrólise de triglicerídeos (ácidos graxos livres) ou, mesmo, relacionado à precipitação de princípios ativos (MASMOUDI *et al.*, 2005).

O limite de aceitação para o parâmetro de pH foi a variação percentual de $\pm 5\%$ dos valores de pH do período de 90 dias de armazenamento em relação ao tempo de 24 horas após o preparo (t_0), além de levar em consideração a percepção visual e a eficácia da formulação (ISAAC *et al.*, 2008). A **Tabela 3** indica as variações dos valores de pH ao longo do estudo de estabilidade.

Conforme os dados de variações de pH (parâmetro físico-químico) presentes na **Tabela 3**, constatou-se que as formulações **S**, **M** e **MS** apresentaram variações dos valores de pH menores que 5% nas 3 condições de estudo: geladeira ($5,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$), estufa ($45,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$) e temperatura ambiente ($25,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$) durante o período de 90 dias, nas duas bases cosméticas testadas (**A** e **B**).

A exceção desta observação foi a formulação **S** quando submetida à estufa ($45,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$) e incorporada à base cosmética Hostacerin[®]SAF que teve uma diminuição do valor de pH 6,8 (t_0) para pH 6,4 (t_{90}), representando uma variação de 5,9%. Esta variação é admissível, pois a formulação quando submetida a esta condição considerada agressiva, apresentou impacto da alta temperatura e umidade. Por isto, é considerável uma variação aceitável pela legislação pertinente e quando comparado à temperatura ambiente (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004).

Tabela 3 – Avaliação do valor de pH das formulações fotoprotetoras desenvolvidas com as bases cosméticas **A** (Crodafos[®] CES + Uniox[®] C) e **B** (Hostacerin[®] SAF) durante o Teste de Estabilidade Normal (TEN)

A							
tempo (dias)		t0	t15	t30	t60	t90	
Formulação	Condição	pH					% pH
S	G	6,1	6,0	6,0	6,1	6,0	1,6
	E		6,0	6,0	6,1	6,0	1,6
	TA		6,0	6,0	6,1	6,0	1,6
M	G	6,4	6,3	6,3	6,4	6,3	1,6
	E		6,3	6,3	6,4	6,4	-
	TA		6,3	6,3	6,5	6,4	-
MS	G	6,1	6,0	6,0	6,0	5,9	3,3
	E		5,9	5,9	5,9	5,9	3,3
	TA		5,9	5,9	6,0	6,0	1,6
B							
S	G	6,8	6,8	6,8	6,8	6,6	2,9
	E		6,8	6,7	6,5	6,4	5,9
	TA		6,8	6,6	6,6	6,6	2,9
M	G	6,8	6,8	6,8	6,8	6,7	1,5
	E		6,7	6,8	6,8	6,6	2,9
	TA		6,7	6,8	6,8	6,8	-
MS	G	6,8	6,8	6,9	6,8	6,8	-
	E		6,9	6,7	6,7	6,5	4,4
	TA		6,8	6,9	6,8	6,7	1,5

Legenda: % pH: variação percentual do valor de pH do tempo zero (t0) em relação à última medição após 90 dias (t90); t0: tempo inicial das leituras (24 horas após o preparo); t15, 30, 60 e 90 = após 15, 30, 60 e 90 dias de armazenamento; G – Geladeira (5,0 ± 0,5°C); E – Estufa (45,0 ± 0,5°C e 75% de umidade relativa); TA - Temperatura ambiente (25,0 ± 2,0°C, sob luz indireta); leitura em duplicata; (S) 0,4% (p/p) de succinato de rutina; (M) 7,5% (p/p) de 4-metoxicinamato de 2-etilhexila + 3,0% (p/p) de 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona + 3,0% (p/p) de dióxido de titânio; (MS) 7,5% (p/p) de 4-metoxicinamato de 2-etilhexila + 3,0% (p/p) de 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona + 3,0% (p/p) de dióxido de titânio + 0,4% (p/p) de succinato de rutina.

5.4 Análise do comportamento reológico das formulações

A análise da viscosidade aparente também é importante para avaliar alterações na estrutura da formulação que nem sempre são perceptíveis sensorialmente (análises organolépticas). Esta avaliação está relacionada à estabilidade física da formulação, sendo que a redução dos valores de viscosidade indica desestabilização da estrutura. Cada componente, ativo ou não, o tempo de armazenamento e as condições de armazenagem podem afetar a estabilidade da formulação e dessa forma, o comportamento reológico da formulação foi acompanhado por meio das análises

da viscosidade aparente (em ambas as bases cosméticas), curva de fluxo e área de histerese, estes dois últimos dados foram acompanhados apenas para a base cosmética **A** (Crodafos[®]CES + Uniox[®]C) (MASMOUDI *et al.*, 2005; TADROS, 2004).

O limite de aceitação para o parâmetro de viscosidade foi a variação percentual de $\pm 20\%$ e para a área de histerese de $\pm 25\%$, dos valores do período de 90 dias de armazenamento em relação ao tempo de 24 horas após o preparo (t_0), além de levar em consideração a percepção visual decorrida de alterações e a eficácia da formulação. As **Tabelas 4 e 5** demonstraram as variações dos valores de viscosidade e área de histerese (para a base cosmética Crodafos[®]CES + Uniox[®]C), respectivamente, ao longo do estudo de estabilidade.

Os dados de viscosidade aparente foram analisados estatisticamente por meio de análise de variância univariada (*one-way* ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Fisher LSD a 5% de probabilidade (GRANATO *et al.*, 2010). Estas análises foram feitas comparando-se os dados de uma mesma linha da tabela, considerando o tipo de amostra e a condição a que foram submetidas as amostras no decorrer dos 90 dias.

O succinato de rutina em associação ou não aos filtros químicos e físico apresentou-se mais estável quanto à variação dos valores de viscosidade aparente no período de 90 dias quando incorporados na base cosmética Hostacerin[®]SAF (**B**) (**Tabela 4**). A exceção a esta análise foi observada para a amostra **MS** na condição da estufa ($45,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$) tendo um aumento no valor de viscosidade de 2150 (t_0) para 2900 (t_{90}) mPa.s (elevação de 34,9%) e um maior (49,3%) na base cosmética Crodafos[®]CES + Uniox[®]C (**A**) na condição de estufa, de 1023 (t_0) para 1630 (t_{90}) mPa.s. Foi encontrada diferença significativa entre os tempos de análise após 15 dias de armazenamento, quando foram verificados os dados de área de histerese desta mesma amostra na base cosmética **A**, ocorreu variação até 4% e não houve alteração significativa com o tempo em nenhuma das condições estudadas: geladeira ($5,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$), estufa ($45,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$) e temperatura ambiente ($25,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$), durante o período de estudo de 90 dias (**Tabela 5**).

A formulação **M**, também, apresentou aumento da viscosidade (t_0 para t_{90}) de 43,4% (de 972 para 1394 mPa.s) e 90,0% (de 972 para 1852 mPa.s), respectivamente, para as condições de armazenamento, geladeira ($5,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$) e estufa ($45,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$), quando incorporada à base cosmética **A** (**Tabela 4**). A mesma comparação foi realizada com esta amostra em relação à área de histerese e foi analisado que houve aumento deste valor (t_0 para t_{90}) em 32,6% (de 34.693 para 45.817 Pa/s) na condição geladeira ($5,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$). Apesar das outras condições não terem apresentado variação percentual acima de 25% (aceitável), verificou-se que ocorrera alterações significativas a partir dos 15 dias de armazenamento (**Tabela 5**).

Entretanto, com a formulação **S** (em ambas as bases cosméticas) não houve variação acima de 20%, mas quando incorporada na base cosmética Crodafo[®]CES + Uniox[®]C, as alterações significativas nas condições estufa ($45,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$) e temperatura ambiente ($25,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$) já começaram a ocorrer a partir dos 15 dias de armazenamento (**Tabela 4**). Quando foi observado os valores de área de histerese nesta mesma base cosmética, verificou-se aumento de até 50% nas 3 condições de estudo: geladeira ($5,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$), estufa ($45,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$) e temperatura ambiente ($25,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$) durante o período de 90 dias de observação e alterações significativas a partir dos 15 dias de armazenamento (**Tabela 5**).

Diante destes resultados obtidos, pode-se observar em relação à viscosidade aparente e área de histerese na condição de temperatura ambiente ($25,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$), que é próxima do cotidiano de uso pelo consumidor, que:

- formulação **MS** → somente apresentou alteração significativa quanto a viscosidade no tempo de 60 dias de armazenamento, indicando-se estável quanto aos parâmetros estudados;
- formulação **M** e **S** → apresentaram alterações significativas, principalmente na base cosmética **A**, quanto aos dois parâmetros estudados a partir dos 15 dias de armazenamento, apresentando sinais de instabilidade quanto à sua estrutura. A formulação **S** foi a que mais apresentou o impacto da luz solar no parâmetro área de histerese, pois teve uma variação (t_0 para t_{90}) de 40,92% (de 13.423 para 18.917 Pa/s).

Mudanças nas propriedades reológicas de emulsões, principalmente fotoprotetoras, representam importantes alertas precoces de diminuição ou mesmo perda da eficácia do produto (GASPAR; MAIA CAMPOS, 2003).

O cálculo do valor estatístico de Fisher (F), que indica a força das interações entre as variáveis (formulações, tempo e condições de armazenamento), sendo este valor diretamente proporcional à força da interação, notou-se que as maiores interações ocorreram nos valores de viscosidade:

- **A** (Crodafo[®]CES + Uniox[®]C) → foi maior para a interação formulação x condição de armazenamento ($F=10,9762$ com $p<0,05$);
- **B** (Hostacerin[®]SAF) → valor de $F = 3,43$ ($p<0,05$) a maior interação foi maior na condição e o tempo.

O parâmetro estudado viscosidade foi o que apresentou maior variação dos valores em relação ao tempo, temperatura e às bases cosméticas estudadas. Isto poderia se justificar no caso das bases cosméticas por apresentarem propriedades distintas quanto à sua carga e consequente interação com os componentes presentes, como por exemplo: base **A** teve a presença de dois agentes emulsionantes distintos, mistura do sistema tensoativo aniônico constituído de éster do

ácido fosfórico e álcool cetosteárilico fosfórico (Croda[®] CES) com o sistema tensoativo não iônico – álcoois graxos, derivados do poliol e éter de álcool graxo de glicose (Uniox[®] C). No entanto, a base **B** teve a presença de um agente emulsionante aniônico (Hostacerin[®] SAF) (RIBEIRO, 2006).

Tabela 4 – Avaliação da viscosidade aparente das formulações fotoprotetoras desenvolvidas com as bases cosméticas **A** (Croda[®] CES + Uniox[®] C) e **B** (Hostacerin[®] SAF) durante o Teste de Estabilidade Normal (TEN)

A							
Tempo (dias)		t0	t15	T30	t60	T90	
Formulação	Condição	Viscosidade aparente (mPa.s ± DP)					% η
S	G	773 ± 2 ^a	826 ± 11 ^a	815 ± 20 ^a	828 ± 54 ^a	789 ± 1 ^a	2,06
	E		975 ± 78 ^b	892 ± 15 ^{a,b}	867 ± 54 ^{a,b}	834 ± 15 ^{a,b}	7,89
	TA		893 ± 26 ^{a,b}	913 ± 45 ^b	765 ± 34 ^a	866 ± 60 ^{a,b}	12,03
M	G	972 ± 88 ^a	1254 ± 89 ^{a,b}	1287 ± 33 ^{a,b}	1295 ± 165 ^{a,b}	1394 ± 94 ^b	43,41
	E		1599 ± 431 ^{a,b}	1773 ± 92 ^b	1988 ± 77 ^b	1852 ± 182 ^b	90,01
	TA		1067 ± 49 ^{a,b}	1387 ± 107 ^b	1088 ± 132 ^{a,b}	1032 ± 85 ^a	6,17
MS	G	1023 ± 49 ^a	1284 ± 12 ^b	1235 ± 45 ^b	1237 ± 33 ^b	1246 ± 88 ^b	21,79
	E		1627 ± 92 ^b	1633 ± 1 ^b	1742 ± 84 ^b	1630 ± 24 ^b	49,32
	TA		1154 ± 94 ^a	1054 ± 4 ^a	1073 ± 86 ^a	1049 ± 103 ^a	2,54
B							
S	G	1700 ± 568 ^a	1800 ± 566 ^a	1800 ± 66 ^a	1850 ± 136 ^a	1800 ± 166 ^a	5,88
	E		1550 ± 495 ^a	1600 ± 566 ^a	1900 ^a	1950 ± 354 ^a	14,70
	TA		1700 ± 431 ^a	1750 ± 45 ^a	1650 ± 95 ^a	1650 ± 95 ^a	7,05
M	G	2850 ^a	3350 ± 150 ^a	3550 ± 636 ^a	3250 ± 212 ^a	3250 ± 212 ^a	14,03
	E		3250 ± 212 ^{a,b}	3650 ± 95 ^b	3550 ± 136 ^b	3350 ± 85 ^b	17,54
	TA		3150 ± 215 ^a	3250 ± 70,7 ^a	3050 ± 71 ^a	3100 ± 124 ^a	8,77
MS	G	2150 ± 71 ^a	2460 ± 80 ^{a,b}	2500 ± 83 ^b	2650 ± 71 ^b	2400 ± 141 ^{a,b}	11,62
	E		2700 ± 141 ^b	2950 ± 212 ^b	2900 ^b	2900 ± 83 ^b	34,88
	TA		2100 ^a	2200 ± 103 ^a	2450 ± 181 ^b	2350 ± 71 ^b	9,30
P (ANOVA)*		<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	

Legenda: % η: variação percentual do valor de viscosidade aparente do tempo zero (t0) em relação à última medição após 90 dias (t90); t0: tempo inicial das leituras (24 horas após o preparo); t15, 30, 60 e 90 = após 15, 30, 60 e 90 dias de armazenamento; Média ± Desvio Padrão (n = 2); **G** – Geladeira (5,0 ± 0,5°C); **E** – Estufa (45,0 ± 0,5°C e 75% de umidade relativa); **TA** - Temperatura ambiente (25,0 ± 2,0°C, sob luz indireta); (**S**) 0,4% (p/p) de succinato de rutina; (**M**) 7,5% (p/p) de 4-metoxicinamato de 2-etilhexila + 3,0% (p/p) de 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona + 3,0% (p/p) de dióxido de titânio; (**MS**) 7,5% (p/p) de 4-metoxicinamato de 2-etilhexila + 3,0% (p/p) de 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona + 3,0% (p/p) de dióxido de titânio + 0,4% (p/p) de succinato de rutina. Letras diferentes sobrescritas numa mesma linha representam dados diferentes estatisticamente de acordo com o teste de Fisher LSD (p < 0,05). *Valores de probabilidade obtidos por one-way ANOVA

Tabela 5 – Avaliação da área de histerese das formulações fotoprotetoras desenvolvidas com a base cosmética **A** (Crodafos® CES + Uniox® C) durante o Teste de Estabilidade Normal (TEN)

Tempo (dias)		T0	t15	T30	t60	t90	
Formulação	Condição	Área de histerese (Pa/s ± DP)					%AH
S	G	13423 ± 345 ^a	17663 ± 435 ^b	17607 ± 379 ^b	18833 ± 691 ^c	20087 ± 990 ^d	49,64
	E		23283 ± 647 ^c	21616 ± 950 ^{b,c}	20504 ± 246 ^{b,c}	18567 ± 1983 ^b	38,32
	TA		20232 ± 206 ^d	19963 ± 228 ^d	16555 ± 1024 ^b	18917 ± 46 ^c	40,92
M	G	34693 ± 944 ^a	36657 ± 1772 ^a	42965 ± 313 ^b	47661 ± 398 ^c	45817 ± 1186 ^{b,c}	32,6
	E		32072 ± 745 ^c	32923 ± 522 ^{b,c}	31927 ± 302 ^c	31742 ± 354 ^c	8,5
	TA		38127 ± 850 ^b	46007 ± 500 ^c	37063 ± 696 ^{a,b}	43297 ± 1019 ^c	24,08
MS	G	36581 ± 943 ^a	37779 ± 632 ^a	38967 ± 898 ^a	37412 ± 272 ^a	37938 ± 1800 ^a	3,70
	E		37028 ± 674 ^a	36996 ± 896 ^a	38355 ± 544 ^a	37767 ± 555 ^a	3,24
	TA		37913 ± 39 ^a	38112 ± 472 ^a	37833 ± 470 ^a	38055 ± 932 ^a	4,02
P (ANOVA)*		<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	

Legenda: % AH: variação percentual do valor de área de histerese do tempo zero (t0) em relação à última medição após 90 dias (t90); t0: 24 horas após o preparo; t15, 30, 60 e 90 = após 15, 30, 60 e 90 dias de armazenamento; Média ± Desvio Padrão (n = 2); G – Geladeira (5,0 ± 0,5°C); E – Estufa (45,0 ± 0,5°C e 75% de umidade relativa); TA - Temperatura ambiente (25,0 ± 2,0°C, sob luz indireta); (S) 0,4% (p/p) de succinato de rutina; (M) 7,5% (p/p) de 4-metoxicinamato de 2-etilhexila + 3,0% (p/p) de 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona + 3,0% (p/p) de dióxido de titânio; (MS) 7,5% (p/p) de 4-metoxicinamato de 2-etilhexila + 3,0% (p/p) de 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona + 3,0% (p/p) de dióxido de titânio + 0,4% (p/p) de succinato de rutina. Letras diferentes sobrescritas numa mesma linha representam dados diferentes estatisticamente de acordo com o teste de Fisher LSD (p <0,05). *Valores de probabilidade obtidos por *one-way* ANOVA

De acordo com a curva de fluxo, apresentada na **Figura 7A** e comparada com a **7C**, a formulação **MS** nas 3 condições ensaiadas (temperatura ambiente, estufa, geladeira) no período de 90 dias foi caracterizada como fluxo não-Newtoniano pseudoplástico com área de histerese (tixotropia). Este comportamento reológico foi observado em todas as formulações **S** e **M** (**Figura 7B**) nas mesmas condições, mas com diferentes áreas de histerese dependendo dos filtros incorporados associados ou não ao succinato de rutina e dependendo da base cosmética usada. Além disso, a **Figura 7B** demonstrou a tixotropia de forma gráfica a partir da curva de fluxo das formulações **S**, **M** e **MS**, na qual se tem uma curva ascendente e outra descendente, demonstrando o comportamento da tensão quando a taxa de cisalhamento foi aumentada (**curva I**), e quando a mesma foi diminuída até cessar (**curva II**). Quanto maior a área entre a curva **I** e **II**, denominada área de histerese; mais tixotrópico será o sistema.

Figura 7. A) Curva de fluxo da formulação **MS** após o período de 90 dias de análise submetida à condição de geladeira ($5,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$), estufa ($45,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$) e de temperatura ambiente ($25,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$). B) Curva de fluxo das formulações **S**, **M** e **MS** obtida em 24 horas após o preparo das formulações (t_0). C) Curva de fluxo genérica para comparar com as obtidas neste estudo e fazer a caracterização

Legenda: (**S**) 0,4% (p/p) de succinato de rutina; (**M**) 7,5% (p/p) de 4-metoxicinamato de 2-etilhexila + 3,0% (p/p) de 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona + 3,0% (p/p) de dióxido de titânio; (**MS**) 7,5% (p/p) de 4-metoxicinamato de 2-etilhexila + 3,0% (p/p) de 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona + 3,0% (p/p) de dióxido de titânio + 0,4% (p/p) de succinato de rutina

O comportamento tixotrópico é adequado para formulações com indicação tópica fotoprotetora (alvo desta pesquisa), pois após a aplicação da tensão a emulsão apresenta facilidade para fluir, ocorrendo espalhamento adequado durante a aplicação e formação de filme uniforme na pele. Este dado de comportamento não-Newtoniano pseudoplástico com área de histerese não foi confirmado por cálculo do valor do índice de fluxo (IF), pois seriam menores que valor $n < 1$, isto só foi realizado pela observação dos gráficos obtidos.

Nem todos os gráficos foram plotados, porém todos os dados obtidos foram relacionados na **Tabela 5** (base cosmética **A**).

As áreas de histerese foram calculadas pelo *software* Rheoplus/32 3.40 das formulações **S**, **M** e **MS**, e apresentaram os seguintes valores médios: 13.423 ± 943 , 34.693 ± 944 e 36.581 ± 345 Pa/s, respectivamente, sendo realizadas as análises em duplicata (**Tabela 5**) para o tempo zero (24 horas após o preparo). Os valores médios para o tempo de 90 dias na condição de geladeira foram: **S** (18.917 ± 46), **M** (43.297 ± 1019) e **MS** (38.055 ± 932). Este comportamento indicou que a adição dos filtros químicos e físico (formulação **M**) na base cosmética **A** teve influência das temperaturas ao longo do tempo de 90 dias, pois houve aumento no valor de tixotropia, indicando sinais de instabilidade. Porém, quando a mesma formulação teve a presença do succinato de rutina (**MS**) a variação ao longo do tempo do valor de tixotropia foi mínima (4,0%) demonstrando que este composto estabiliza adequadamente os filtros nesta formulação com este comportamento reológico.

As formulações **S**, **M** e **MS** apresentaram comportamento tixotrópico, pois a viscosidade foi dependente do tempo e decresceu com ele, sob condições de taxa ou de tensão de cisalhamento constante ($200,0 \text{ s}^{-1}$), seguido por uma recuperação gradual quando se interrompe o cisalhamento (**Figura 8**). No caso de protetor solar, o comportamento pseudoplástico e tixotrópico produz uma cobertura sobre a pele que ocasionará a distribuição uniforme do filtro solar garantindo a eficácia fotoprotetora, ou seja, este material tem a capacidade de se tornar menos fluido para facilitar a aplicação e, posteriormente, o filme aplicado pode elevar sua viscosidade instantaneamente resistindo ao escorrimento. No entanto, os materiais Newtonianos não têm a mesma efetividade, porque quando espalhados sobre a pele eles escorrem muito rápido reduzindo o filme protetor e interferindo na eficácia fotoprotetora (GASPAR; MAIA CAMPOS, 2003; SCHRAMM, 2006).

Figura 8. Comportamento reológico tixotrópico das formulações **S**, **M** e **MS**. Os valores de viscosidade aparente foram analisados na velocidade máxima de cisalhamento ($200,0 \text{ s}^{-1}$)

Legenda: (**S**) 0,4% (p/p) de succinato de rutina; (**M**) 7,5% (p/p) de 4-metoxicinamato de 2-etilhexila + 3,0% (p/p) de 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona + 3,0% (p/p) de dióxido de titânio; (**MS**) 7,5% (p/p) de 4-metoxicinamato de 2-etilhexila + 3,0% (p/p) de 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona + 3,0% (p/p) de dióxido de titânio + 0,4% (p/p) de succinato de rutina.

5.5 Análise da característica funcional: atividade antirradicalar

A pele é frequentemente exposta ao estresse oxidativo causado pelos radicais livres, sendo importante o uso de agentes antioxidantes de uso tópico, entre eles, a rutina e a quercetina. Ambos são pertencentes a uma importante classe de flavonoides, sendo extensamente encontrados na natureza (LUPO, 2001; PEDRIALI *et al.*, 2008).

Participam dentre outras atividades, na inibição de formação de radicais livres em vários estágios evitando a peroxidação lipídica, e também no caso da quercetina inibe o estresse oxidativo cutâneo induzido por radiação UVB (LUPO, 2001). A aplicação da rutina em formas cosméticas ou farmacêuticas de uso tópico é muito limitada devido à sua baixa solubilidade em água fazendo com que não permaneça estável em formulação por um longo período de tempo. Com o intuito de melhorar esta solubilidade foi sintetizado o seu derivado o succinato de rutina (PEDRIALI *et al.*, 2008).

Além disso, é importante na fase de desenvolvimento de novos produtos a escolha de uma base cosmética adequada que mantenha a atividade antirradicalar com o tempo (LUPO, 2001).

Dentro do exposto anteriormente, a análise da atividade antirradicalar durante o Teste de Estabilidade Normal ao longo do tempo de 90 dias foi importante evidenciar o comportamento funcional do succinato de rutina quando incorporado em diferentes bases cosméticas, associado

ou não aos filtros solares em condições diversas de temperatura, umidade e exposição à radiação solar. O intuito desta análise foi verificar a influência da ação inibitória aos radicais livres em relação à atividade de interação dos filtros solares associados (orgânicos e inorgânico).

O ensaio para medição da atividade antirradicalar foi realizada com o DPPH[•], que é um radical livre instável que estabiliza-se recebendo um elétron ou radical hidrogênio. Com isto, sua banda de absorção é forte em 517 nm. As vantagens da utilização deste método é a avaliação rápida com grande quantidade de amostras em um período curto de tempo e é um método sensível que detecta pequenas concentrações do ativo testado (DI MAMBRO; FONSECA, 2005).

Existe atualmente uma tendência em fazer uso de produtos vegetais como antioxidantes por serem de origem natural. Nestes casos, porém um fator importante a se considerar é se os ativos antioxidantes do produto irão manter essa atividade após serem incorporados em formulação de uso tópico.

Com isto, a avaliação da atividade antirradicalar da rutina a 0,1% (p/v) e succinato de rutina a 0,4% (p/v) em solução alcoólica foi realizada tendo os seguintes valores de inibição do radical DPPH[•] de 79,0% e 84,0%, respectivamente. Comparando o valor de porcentagem de inibição do succinato de rutina quando em formulação, foi verificado que sua atividade diminuiu em torno de 40%. Esta diminuição se deve a interações físico-químicas do flavonoide com os diversos componentes de uma formulação cosmética. Em outras palavras, as emulsões são sistemas complexos, polidispersos contendo diferentes tensoativos de natureza química diversa, e que podem estabilizar as emulsões por estabilização eletrostática ou estérica podendo influenciar o mecanismo antirradicalar do succinato de rutina (RIBEIRO, 2006).

Quanto ao parâmetro físico-químico funcional (atividade antirradicalar) do succinato de rutina quando incorporado em sistemas emulsionados, conforme consta na **Tabela 6**, as amostras **S** e **MS** apresentaram intervalo de inibição do radical DPPH[•] de 32,0 a 36,0% (t_0), podendo ocorrer diminuição para 27,0% (t_{90}) para **S** na condição de temperatura ambiente ($25,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$).

A análise de homogeneidade das variâncias (F teste ANOVA) indicou similaridade para a amostra **MS** ao longo do período de 90 dias, principalmente na base cosmética (**A**). No entanto, quando incorporada na base (**B**) houve alterações significativas na condição de geladeira ($5,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$) a partir dos 15 dias e na condição de estufa ($45,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$) a partir dos 60 dias de armazenamento. Isto demonstrou que o parâmetro funcional foi influenciado de maneira diferente ao físico-químico, pois em relação à atividade antirradicalar a base cosmética (Crodafos[®]CES + Uniox[®]C) estabilizou melhor a formulação **MS**, quando comparada à análise de viscosidade onde ocorreu o comportamento contrário.

A formulação **S**, ao contrário da formulação **MS**, apresentou alterações significativas em relação a aumento ou diminuição da atividade antirradicalar ao longo do tempo de armazenamento, em diversas condições de análise e indiferente da base cosmética incorporada. Com isto, o succinato de rutina foi mais estável nestas condições descritas quando associadas aos filtros solares.

A amostra **M** teve uma atividade antirradicalar baixa, em torno de 12,0%; quando incorporada na base (**B**) houve uma diminuição ao longo do tempo nas 3 condições estudadas para 2,3%. A presença da succinato de rutina foi importante para ajudá-los a se estabilizar melhor nas diversas condições, como é indicado na **Tabela 6**.

Dados na literatura de avaliação de estabilidade de formulações tópicas quanto à atividade antirradicalar de substâncias antioxidantes, observou-se que no trabalho de Di Mambro e Fonseca (2005), onde estes autores estudaram o comportamento da incorporação do extrato de *Nelumbium speciosum* a 2% (p/v) em emulsões cosméticas e que possui $0,20 \pm 0,006$ µg de rutina/mg de extrato da planta. Após 1 mês do estudo de estabilidade em temperatura ambiente, o valor de inibição do radical DPPH• foi em torno de 25,0%.

No estudo de estabilidade em 90 dias de emulsões fluidas O/A contendo como (FEL) ou não (FE) agente emulsionante a lecitina de soja a 2%, foi incorporado o extrato de *Ptychopetalum olacoides* a 5% (p/v), com equivalente de concentração de 1,2 % p/p em rutina. Na condição de estufa ($40,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$), houve uma diminuição da concentração de total de flavonoides de 34,16% para as formulações FE e 35,12% para as formulações FEL. Neste trabalho é mostrado que mesmo fazendo o uso da lecitina de soja, a estabilidade da rutina com o aumento da temperatura foi alterada (BABY *et al.*, 2007).

Estas comparações com a literatura mostraram que atividade antirradicalar de substância de origem vegetal quando analisada em sistemas emulsionados em diversas temperaturas pode sofrer alterações.

5.6 Análise da característica funcional: eficácia fotoprotetora

Compostos polifenólicos presentes em extratos vegetais conferem ação antioxidante explorada nas formulações antienvhecimento e fotoprotetoras com apelo natural. Atualmente, diversos trabalhos investigam a ação dos antioxidantes na fotoproteção e há um crescente interesse em construir múltiplas estratégias de defesa. Alguns estudos avaliam a ação dos mesmos na prevenção da formação de eritema cutâneo por meio da determinação do valor de

FPS e outros analisam seus efeitos protetores frente aos danos moleculares gerados pelo estresse oxidativo induzido pela radiação UV (WANG; BALAGULA; OSTERWALDER, 2010).

Segundo Matsui e colaboradores (2009), o FPS pode não refletir as propriedades de fotoproteção de extratos vegetais, substâncias antioxidantes e enzimas reparadoras de DNA. A determinação de FPS é baseada na formação de eritema, entretanto, uma cascata de outras reações ocorre quando a pele humana é exposta à radiação UV. Diversos danos são gerados como: estresse oxidativo ao DNA, formação de dímeros de pirimidina, danos ao DNA mitocondrial, liberação de citocinas pró-inflamatórias e imunossupressivas, isomerização do ácido *trans*-urocânico (imunossupressor) e mutações no gene p53. Dessa forma, os agentes de fotoproteção que não atuam, convencionalmente, como filtros orgânicos (químicos) ou inorgânicos (físicos) devem ser avaliados, adicionalmente, quanto à capacidade de reduzirem os danos citados anteriormente.

Quanto ao estudo de eficácia fotoprotetora (**Tabela 7**), foi observado que as amostras tiveram menores variações ao longo do tempo de Estudo de Estabilidade Normal em relação à variável comprimento de onda crítico nas 3 condições de temperatura e em ambas as bases cosméticas (**A** e **B**). As formulações **S** e **M** tiveram sinais de instabilidade quanto à manutenção da eficácia fotoprotetora: razão UVA/UVB e FPS, respectivamente, com prevalência na base cosmética (**A**) com variações que atingiram o máximo de 64,3% (estufa: $45,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$) e 48,5% (geladeira: $5,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$). Além disso, ambas as formulações apresentaram diferenças significativas ao longo do tempo de armazenamento, em diversas condições de análise e indiferente da base cosmética incorporada.

Entretanto, para a amostra **MS**, os valores de eficácia fotoprotetora não apresentaram diferenças significativas e alterações abaixo de 4,0% em ambas as bases cosméticas (**A** e **B**), conforme indicado na **Tabela 7**, e nas 3 condições estudadas, indicando a manutenção da eficácia fotoprotetora ao longo do tempo (90 dias). Em outras palavras, não houve alteração significativa das concentrações e também da estrutura química dos filtros orgânicos e inorgânico associados ao succinato de rutina, com isto a formulação **MS** manteve sua ação frente à radiação UVB e supostamente frente à UVA.

Os parâmetros *in vitro* estudados (valor de FPS, comprimento de onda crítico e razão UVA/UVB) precisariam ser confirmados num estudo *in vivo* complementando estes dados obtidos no presente trabalho (DIFFEY *et al.*, 2000).

Os valores da eficácia fotoprotetora podem ser correlacionados com os de tixotropia e atividade antirradicalar que também não apresentaram variações significativas ao longo do

estudo de estabilidade, principalmente quando a associação **MS** foi incorporada à base cosmética (Crodafo[®]CES + Uniox[®]C).

Tabela 6 – Avaliação da atividade antirradicalar das formulações fotoprotetoras desenvolvidas com as bases cosméticas **A** (Crodafo[®]CES + Uniox[®]C) e **B** (Hostacerin[®]SAF) durante o Teste de Estabilidade Normal (TEN)

A						
Tempo (dias)		t0	t15	t30	t60	t90
Formulação	Condição	% de inibição do radical DPPH• ± DP				
S	G	36,78 ± 1,72 ^a	36,80 ± 1,72 ^a	32,39 ± 1,26 ^a	34,88 ± 1,19 ^a	31,97 ± 0,97 ^a
	E		45,13 ± 2,34 ^c	32,28 ± 0,11 ^{a,b}	29,08 ± 0,22 ^b	28,45 ± 0,55 ^b
	TA		42,38 ± 3,04 ^b	36,66 ± 0,62 ^{a,b}	31,24 ± 1,05 ^{a,c}	27,30 ± 2,84 ^c
M	G	11,59 ± 0,89 ^a	11,59 ± 0,89 ^a	8,72 ± 1,03 ^a	11,76 ± 1,56 ^a	8,95 ± 1,19 ^a
	E		9,32 ± 0,59 ^a	9,50 ± 1,80 ^a	12,91 ± 0,58 ^a	10,71 ± 0,62 ^a
	TA		9,82 ± 0,88 ^a	8,28 ± 0,65 ^a	11,39 ± 1,02 ^a	9,85 ± 1,66 ^a
MS	G	36,21 ± 0,59 ^a	36,19 ± 0,58 ^a	36,67 ± 1,19 ^a	37,30 ± 0,51 ^a	36,83 ± 0,97 ^a
	E		37,30 ± 1,87 ^a	35,81 ± 0,80 ^a	36,07 ± 0,93 ^a	36,12 ± 0,14 ^a
	TA		36,97 ± 0,30 ^a	36,95 ± 0,23 ^a	36,02 ± 0,34 ^a	35,69 ± 0,48 ^a
B						
S	G	32,51 ± 0,27 ^a	33,88 ± 0,77 ^a	29,46 ± 0,23 ^b	28,23 ± 0,20 ^b	33,76 ± 0,63 ^a
	E		30,97 ± 0,15 ^b	30,80 ± 0,24 ^b	29,62 ± 0,22 ^c	32,86 ^a
	TA		33,85 ± 0,14 ^a	34,94 ± 0,27 ^a	26,51 ± 0,20 ^b	31,17 ^c
M	G	12,64 ± 0,98 ^a	11,50 ± 0,88 ^b	8,47 ± 0,16 ^c	6,22 ± 0,05 ^d	3,31 ± 0,33 ^c
	E		12,27 ^a	15,26 ± 0,24 ^d	7,48 ± 0,58 ^c	3,51 ± 0,32 ^b
	TA		12,3 ^{a,b}	12,06 ± 0,19 ^b	5,88 ± 0,14 ^c	2,31 ± 0,35 ^d
MS	G	35,16 ± 0,89 ^a	36,43 ± 0,19 ^b	35,73 ^a	36,27 ^{a,b}	34,81 ^c
	E		35,02 ± 0,03 ^a	35,45 ± 0,12 ^a	34,30 ± 0,20 ^b	34,76 ± 0,94 ^b
	TA		35,48 ± 0,27 ^a	35,18 ± 0,76 ^a	34,56 ± 0,34 ^{a,b}	34,05 ^b
P (ANOVA)*		<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05

Legenda: t₀: tempo inicial das leituras (24 horas após o preparo); t15, 30, 60 e 90 = após 15, 30, 60 e 90 dias de armazenamento; Média ± Desvio Padrão (n = 2); **G** – Geladeira (5,0 ± 0,5°C); **E** – Estufa (45,0 ± 0,5°C e 75% de umidade relativa); **TA** - Temperatura ambiente (25,0 ± 2,0°C, sob luz indireta); **DPPH•**: 2,2-difenil-1-picridrazila. (**S**) 0,4% (p/p) de succinato de rutina; (**M**) 7,5% (p/p) de 4-metoxicinamato de 2-etilhexila + 3,0% (p/p) de 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona + 3,0% (p/p) de dióxido de titânio; (**MS**) 7,5% (p/p) de 4-metoxicinamato de 2-etilhexila + 3,0% (p/p) de 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona + 3,0% (p/p) de dióxido de titânio + 0,4% (p/p) de succinato de rutina. Letras diferentes sobrescritas numa mesma linha representam dados diferentes estatisticamente de acordo com o teste de Fisher LSD (p < 0,05). *Valores de probabilidade obtidos por *one-way* ANOVA

Tabela 7 – Avaliação da eficácia fotoprotetora → FPS, λ_c , razão UVA/UVB das formulações fotoprotetoras desenvolvidas com as bases cosméticas **A** (Croda[®] CES + Uniox[®] C) e **B** (Hostacerin[®] SAF) durante o Teste de Estabilidade Normal (TEN) (**continua**)

A															
tempo (dias)		t0					t15					t30			
Formulação	Condição Ambiental	FPS	CV (%)	λ _c (nm)	Razão UVA/UVB		FPS	CV (%)	λ _c (nm)	Razão UVA/UVB		FPS	CV (%)	λ _c (nm)	Razão UVA/UVB
S	G	1,00	1,80	383 ^a	1,005 ^a		1,00	2,35	371 ^b	1,354 ^c		1,00	2,00	381 ^{a,b}	1,227 ^d
	E						1,00	2,60	378 ^b	1,235 ^c		1,00	2,45	377 ^b	1,286 ^b
	TA						1,00	1,60	380 ^d	1,048 ^b		1,00	2,75	373 ^b	1,062 ^c
M	G	19,19 ^a	16,00	373 ^a	0,507 ^a		14,76 ^b	7,30	369 ^b	0,474 ^b		20,91 ^a	7,55	369 ^b	0,462 ^c
	E						14,13 ^b	13,20	369 ^b	0,465 ^c		19,89 ^a	15,65	369 ^b	0,476 ^b
	TA						11,44 ^b	7,05	357 ^d	0,355 ^c		20,33 ^a	3,00	370 ^b	0,488 ^b
MS	G	20,25 ^a	11,00	369 ^a	0,449 ^a		20,20 ^a	11,50	369 ^a	0,449 ^a		20,00 ^a	2,45	369 ^a	0,449 ^a
	E						20,25 ^a	11,10	369 ^a	0,450 ^{a,b}		20,73 ^a	7,40	368 ^a	0,449 ^a
	TA						20,22 ^a	8,45	369 ^a	0,449 ^a		20,55 ^a	9,55	369 ^a	0,449 ^a
tempo (dias)		t60					t90				t0 a t90				
											% FPS	% λ _c	% Razão UVA/UVB		
S	G	1,00	1,07	384 ^a	1,061 ^c		1,00	1,44	373 ^b	0,569 ^b		-	2,6	43,4	
	E	1,00	1,36	385 ^a	1,080 ^d		1,00	3,24	370 ^c	0,359 ^c		-	3,4	64,3	
	TA	1,00	1,53	384 ^a	1,085 ^d		1,00	1,76	376 ^c	0,634 ^c		-	1,8	36,9	
M	G	13,22 ^b	8,30	368 ^b	0,426 ^d		14,07 ^b	13,40	367 ^b	0,431 ^d		26,7	1,6	15,0	
	E	14,00 ^b	11,36	368 ^b	0,444 ^d		12,61 ^b	11,53	366 ^c	0,415 ^d		34,3	1,9	18,1	
	TA	10,94 ^c	12,82	365 ^c	0,438 ^d		9,89 ^c	8,86	369 ^b	0,450 ^c		48,5	1,1	11,2	
MS	G	20,00 ^a	8,27	369 ^a	0,449 ^a		20,72 ^a	5,76	369 ^a	0,448 ^a		2,3	-	0,2	
	E	20,57 ^a	11,95	369 ^a	0,448 ^{a,b}		20,89 ^a	9,67	369 ^a	0,447 ^b		3,2	-	0,4	
	TA	20,65 ^a	13,60	369 ^a	0,449 ^a		20,57 ^a	13,45	369 ^a	0,448 ^a		1,6	-	0,2	

Tabela 7 – Avaliação da eficácia fotoprotetora → FPS, λ_c , razão UVA/UVB das formulações fotoprotetoras desenvolvidas com as bases cosméticas **A** (Crodafo[®] CES + Uniox[®] C) e **B** (Hostacerin[®] SAF) durante o Teste de Estabilidade Normal (TEN) (**conclusão**)

B

tempo (dias)		t0				T15				t30			
Formulação	Condição	FPS	CV (%)	λ _c (nm)	Razão UVA/UVB	FPS	CV (%)	λ _c (nm)	Razão UVA/UVB	FPS	CV (%)	λ _c (nm)	Razão UVA/UVB
S	G	1,00	0,90	393 ^a	0,880 ^a	1,00	0,60	394 ^{a,b}	0,997 ^d	1,00	0,50	394 ^{a,b}	0,913 ^c
	E					1,00	0,70	393 ^a	1,183 ^d	1,00	0,65	395 ^a	1,238 ^c
	TA					1,00	0,75	395 ^b	1,158 ^c	1,00	0,75	395 ^b	0,946 ^c
M	G	10,31 ^a	14,25	366 ^a	0,454 ^a	9,56 ^a	4,80	367 ^a	0,466 ^c	10,37 ^a	14,65	367 ^a	0,447 ^b
	E					9,00 ^a	7,10	366 ^a	0,444 ^c	11,00 ^a	10,85	366 ^a	0,466 ^b
	TA					9,89 ^a	9,25	366 ^a	0,454 ^a	9,38 ^{a,b}	12,65	366 ^a	0,449 ^b
MS	G	9,73 ^a	11,55	366 ^a	0,451 ^a	9,52 ^a	15,20	366 ^a	0,451 ^a	9,50 ^a	4,55	366 ^a	0,450 ^a
	E					9,83 ^a	6,75	366 ^a	0,450 ^a	9,33 ^a	8,00	366 ^a	0,450 ^a
	TA					9,89 ^a	10,55	366 ^a	0,451 ^a	9,22 ^a	13,20	366 ^a	0,451 ^a
tempo (dias)		t60				t90				t0 a t90			
										% FPS	% λ _c	% Razão UVA/UVB	
	G	1,00	0,55	392 ^a	1,131 ^b	1,00	0,45	395 ^b	1,039 ^c	-	0,5	18,0	
	E	1,00	0,45	393 ^a	1,360 ^b	1,00	0,85	393 ^a	0,982 ^c	-	-	11,6	
	TA	1,00	0,35	392 ^a	1,010 ^d	1,00	0,90	395 ^b	1,320 ^b	-	0,5	50,0	
M	G	9,89 ^a	10,35	367 ^a	0,471 ^d	9,11 ^a	10,35	366 ^a	0,454 ^a	11,6	-	-	
	E	8,78 ^a	6,30	366 ^a	0,463 ^c	9,55 ^a	12,95	366 ^a	0,448 ^d	7,4	-	1,3	
	TA	7,22 ^b	5,20	366 ^a	0,460 ^c	8,63 ^{a,b}	8,85	368 ^b	0,473 ^d	16,3	0,5	4,2	
MS	G	9,43 ^a	8,75	366 ^a	0,450 ^a	9,83 ^a	6,45	366 ^a	0,450 ^a	1,0	-	-	
	E	9,11 ^a	7,95	366 ^a	0,451 ^a	9,32 ^a	10,55	366 ^a	0,451 ^a	4,2	-	-	
	TA	9,32 ^a	10,35	366 ^a	0,451 ^a	9,53 ^a	12,10	366 ^a	0,451 ^a	2,1	-	-	

Legenda: % FPS, λ_c e Razão UVA/UVB: variação percentual do valor de Fator de Proteção Solar, de comprimento de onda crítico zero e Razão UVA/UVB, respectivamente, do tempo zero (t0) a 90 dias; t₀: 24 horas após o preparo; t15, 30, 60 e 90 = após 15, 30, 60 e 90 dias de armazenamento; Média ± Desvio Padrão (n = 2); **G** – Geladeira (5,0 ± 0,5°C); **E** – Estufa (45,0 ± 0,5°C e 75% de umidade relativa); **TA** - Temperatura ambiente (25,0 ± 2,0°C, sob luz indireta); **CV**: Coeficiente de Variação; (**S**) 0,4% (p/p) de succinato de rutina; (**M**) 7,5% (p/p) de 4-metoxycinamato de 2-etilhexila + 3,0% (p/p) de 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona + 3,0% (p/p) de dióxido de titânio; (**MS**) 7,5% (p/p) de 4-metoxycinamato de 2-etilhexila + 3,0% (p/p) de 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona + 3,0% (p/p) de dióxido de titânio + 0,4% (p/p) de succinato de rutina. Letras diferentes sobrescritas numa mesma linha representam dados diferentes estatisticamente de acordo com o teste de Fisher LSD (p < 0,05). Valores de probabilidade obtidos por *one-way* ANOVA (p<0,05) foram calculados para as médias dos valores de FPS, λ_c e Razão UVA/UVB

O cálculo do valor estatístico de Fisher (F), que indica a força das interações entre as variáveis (formulações, tempo e condições de armazenamento), sendo este valor diretamente proporcional à força da interação, notou-se de modo geral (exceto para os dados da viscosidade discutidos anteriormente) que as maiores interações ocorreram entre as formulações e o tempo perante as várias análises realizadas nos dois sistemas emulsionados estudados (**A** - Crodafos[®]CES + Uniox[®]C) e (**B**- Hostacerin[®]SAF) , entre elas:

i) valor de F para pH → (**A**) 10,22 (p<0,05) e (**B**) 2,52 (p<0,05);

ii) valor de F para área de histerese → (**A**) 1,69 (p>0,05). Este ensaio só foi realizado para esta base cosmética;

iii) valor de F para atividade antirradicalar → (**A**) 4,86 (p<0,05) e (**B**) 15,05 (p<0,05);

iv) valor de F para FPS → (**A**) 12,13 (p<0,05) e (**B**) 21,07 (p<0,05);

v) valor de F para comprimento de onda crítico → (**A**) 3,37 (p<0,05) e (**B**) 2,38 (p>0,05) –

Interação da condição e tempo iguais nas amostras **S**, **M** e **MS**;

vi) valor de F para razão UVA/UVB → (**A**) 21,29 (p<0,05) e (**B**) 1,65 (p>0,05).

6 CONCLUSÕES

A realização deste trabalho foi motivada pela necessidade do mercado cosmético em associar substâncias de origem vegetal com filtros solares e que possam agregar uma melhoria na estabilidade físico-química e funcional em formulações fotoprotetoras (sistemas autoemulsionáveis).

O flavonoide succinato de rutina foi escolhido por apresentar as propriedades descritas e por ser um insumo de inovação, além de acrescentar o aumento de solubilidade em relação à rutina. Os dados de estabilidade físico-química e funcional (90 dias de estudo) obtidos de sua associação a filtros químicos e físico, em sistemas complexos autoemulsionantes contendo tensoativos (aniônico e não iônico - Crodafos[®]CES + Uniox[®]C) e (aniônico - Hostacerin[®]SAF) mostraram que:

- ✓ Características organolépticas → discreta modificação na cor das amostras (**S**, **M** e **MS**) na geladeira (que, em geral, ficaram mais claras) e na estufa (que em geral ficaram mais escuras). A variação da temperatura acelerou os processos de decomposição;

- ✓ Valor de pH → não houve alterações significativas, exceto para a formulação **S** (succinato de rutina incorporada à base Hostacerin[®]SAF) quando submetida à estufa (45,0 ± 0,5°C) que teve uma diminuição do valor com variação de 5,9%;

- ✓ Viscosidade → aumento com o decorrer do tempo de análise, sendo a maior variação de 133,84% para a formulação **M** na estufa;

- ✓ Área de histerese → elevação nas formulações **S**, principalmente na exposta à geladeira (49,65%), diminuição desta nas formulações **M** na estufa, podendo comprometer a estrutura da formulação;

- ✓ Atividade antirradicalar → maior variação nas formulações **M**, principalmente a exposta à alta temperatura da estufa (aumento da porcentagem de inibição de 104,39%). As formulações com o succinato de rutina (**S**) apresentaram maiores porcentagens de inibição e, portanto, maior atividade antirradicalar do que as outras formulações;

- ✓ Eficácia fotoprotetora → a formulação que apresentou maiores valores absolutos de FPS foi a **MS**. Quanto ao comprimento de onda crítico e razão UVA/UVB, as formulações que apresentaram maiores valores absolutos e também variações significativas com o tempo, foram as com succinato de rutina (**S**), (principalmente a exposta à estufa, com diminuição de 5,23% no $\lambda_{\text{crítico}}$ e de 66,57% na razão UVA/UVB).

A formulação **MS** mostrou-se com variações não significativas quando incorporada à base cosmética **A** (mistura dos tensoativos aniônicos e não-iônicos) num período de 90 dias em 45°C e 75% de umidade, 5°C e 25°C.

Concluiu-se que a associação do succinato de rutina e os filtros químicos e físicos mostrou-se mais estável, mantendo a eficácia quanto à proteção solar e dentro de suas características reológicas poderia ser a mais bem aceita pelo consumidor. Em outras palavras, esta associação na formulação fotoprotetora manteve sua funcionalidade e teve ação sinérgica com os filtros.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS[‡]

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Legislação. **Resolução RDC n.237, de 22 de agosto de 2002**. Regulamento técnico sobre protetores solares em cosméticos. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2002/237_02rdc.pdf. Acesso em: 27 mar. 2009.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Guia de estabilidade de produtos cosméticos**. Brasília: ANVISA, 2004. v.1, 47p. (Séries temáticas da ANVISA: Qualidade em cosméticos, 1).

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução RDC n.47, de 16 de março de 2006**. Regulamento técnico determina a publicação da “Lista de filtros ultravioletas permitidos para produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes”. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=21264&word>. Acesso em: 27 mar. 2009.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Guia de controle de qualidade de produtos cosméticos**. 2.ed. Brasília: ANVISA, 2008. 121p.

AUSTRALIAN/NEW ZEALAND STANDARD. **AS/NZS 2604:1998**: sunscreen products - evaluation and classification. New South Wales: Standards Australia; Wellington: Standards New Zealand, 1998. Disponível em: <http://infostore.saiglobal.com/store2/results2.aspx?keyword=AS/NZS%202604:1998&Db=AS&searchType=simple&Status=all&publisher=AS&Max=15&Search=Proceed>. Acesso em: 15 maio 2010.

BABY, A.R.; MACIEL, C.P.M.; ZAGUE, V.; KANEKO, T.M.; CONSIGLIERI, V.O.; VELASCO, M.V.R. Estabilidade de produtos de aplicação tópica: ensaios aplicados aos produtos cosméticos e dermatológicos emulsionados. **International Journal of Pharmaceutical Compounding (Edição Brasileira)**, v.6, n.3, p.130-139, 2004.

BABY, A.R.; MIGLIATO, K.F.; MACIEL, C.P.M.; ZAGUE, V.; PINTO, C.A.S.O.; SALGADO, H.R.N.; KANEKO, T.M.; VELASCO, M.V.R. Accelerated chemical stability data of O/W fluid emulsions containing the extract of *Trichilia catigua* Adr. Juss (and) *Ptychopetalum olacoides* Benth. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n.3, p. 405-412, 2007.

BABY, A.R.; BALOGH, T.S.; PEDRIALI, C.A.; KANEKO, T.M.; VELASCO, M.V.R. UVA I-protection effectiveness of bioactive compound and organic UV filters: an in vitro assessment. **Química Nova**, v.32, n.5, p.1321-1323, 2009.

BARNES, H. Thixotropy - a review. **Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics**, v. 70, n. 1-2, p. 1-33, 1997.

BARON, E.D.; KIRKLAND, E.B.; DOMINGO, D.S. Advances in photoprotection. **Dermatology Nursing**, v.20, n.4, p.265-273, 2008.

BARRY, B.W. Rheology of dermatological vehicles. In: BARRY, B.W., ed. **Dermatological Formulations - Percutaneous Absorption**. New York: Marcel Dekker, 1993. p. 351-439.

[‡] As referências bibliográficas estão de acordo com a norma NBR6023/2002 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

BOOTS THE CHEMIST. **The revised guidelines to the practical measurement of UVA: UVB ratios according to the boots star rating system.** Nottingham: Boots CO PLC, 2004.

BRAND-WILLIAMS, W.; BONDET, V.; BERSET, C. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH[•] free radical method. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v. 30, n.6, p. 609-615, 1997.

BRUMMER, R.; GODERSKY, S. Rheological studies to objectify sensations occurring when cosmetic emulsions are applied to the skin. **Colloids and Surfaces A**, v. 152, n.1, p. 89-94, 1999.

CHARDON, A.; MOYAL, D.; HOURSEAU, C. Persistent pigment as a method for the UVA protection assessment of sunscreens. In: ROUGIER, A.; CHAEFER, H., ed. **Protection of the skin against ultraviolet radiations.** Paris: John Libbey Eurotest, 1998. p.131-137.

COLE, C. Sunscreen protection in the ultraviolet A region: how to measure the effectiveness. **Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine**, v. 17, n.1, p. 2-10, 2001.

CORRÊA, N.M.; CAMARGO Jr, F.B.; IGNÁCIO, R.F.; LEONARDI, G.R. Avaliação do comportamento reológico de diferentes géis hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n.1, p. 73-78, 2005.

DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMUNG. **DIN 67502**: characterization of UVA protection of dermal suncare products by measuring the transmittance with regard to the sun protection factor. Berlin: DIN, 2004. 10p.

DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMUNG. **DIN 67501**: experimental evaluation of erythema protection of external sunscreen products for the human skin. Berlin: DIN, 1984. 6p.

DI MAMBRO, V. M.; FONSECA, M. J. V. Assays of physical stability and antioxidant activity of a topical formulation added with different plant extracts. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 37, n.2, p. 287-295, 2005.

DIFFEY, B.L.; TANNER, P.R.; MATTS, P.J.; NASH, F. In vitro assessment of the broad-spectrum ultraviolet protection of sunscreen products. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v.43, n.6, p.1024-1035, 2000.

EUROPEAN COMMISSION HEALTH AND CONSUMERS. **Cosmetics Ingredients & Substances – CosIng.** Simple or Advanced Search. Disponível em: <http://ec.europa.eu/consumers/cosmetics/cosing/>. Acesso em: 18 dez. 2009.

EUROPEAN COSMETICS ASSOCIATION. COLIPA (European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association). Scientific Committee on Cosmetology of the Commission of the European Union. **Notes of Guidance for Testing of Cosmetic Ingredients for their Safety Evaluation**: Annex 2: Sun Protection Factor Test Method. p.94-289, 1994.

EUROPEAN COSMETICS ASSOCIATION. **Guidelines for evaluating sun product water resistance.** 2005. Disponível em: <http://www.colipa.eu/publications-colipa-the-european-cosmetic-cosmetics-association/guidelines.html?view=item&id=18>. Acesso em: 21 mai. 2010.

EUROPEAN COSMETICS ASSOCIATION. International Sun Protection Factor (SPF) Test Method: COLIPA Guideline. 2006. Disponível em: <http://www.colipa.eu/publications-colipa>

the-european-cosmetic-cosmetics-association/guidelines.html?view=item&id=21. Acesso em: 25 jun. 2010.

EUROPEAN COSMETICS ASSOCIATION. COLIPA *In Vitro* Protection Methods Task Force. **Method for the *in vitro* determination of UVA protection provided by sunscreen products: guidelines** 2007. Disponível em: http://www.univareurope.com/uploads/documents/eu/678Method_for_the_In_Vitro_Determination_of_UVA_Protection_prov.pdf. Acesso em: 21 mai. 2010.

EUROPEAN COSMETICS ASSOCIATION. COLIPA *In Vitro* Protection Methods Task Force. **Guidelines: method for *in vitro* determination of UVA protection, 2009**. Disponível em: <http://www.colipa.eu/publications-colipa-the-european-cosmetic-cosmetics-association/guidelines.html?view=item&id=33>. Acesso em: 25 jun. 2010.

FERRERO, L.; PISSAVINI, M.; DEHAIS, A.; MARGUERIE, S.; ZASTROW, L. Importance of substrate roughness for *in vitro* sun protection assessment. **IFSCC Magazine**, v.9, n.2, p.97-108, 2006.

FIGUEIREDO, E.N.; ARÊAS, J.A.G.; ARÊAS, E.P.G. Rheology of decane/water and triglyceride/water emulsions stabilized by β -casein and sodium caseinate. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.19, n.7, p.1336-1346, 2008.

FITZPATRICK, T.B. Soleil et peau [Sun and skin]. **Journal de Médecine Esthétique**, v.2, p.33-34, 1975.

FLOR, J.; DAVOLOS, M.R.; CORRÊA, M.A. Protetores solares. **Química Nova**, v.30, n.1, p.153-158, 2007.

GALLEGOS, C.; FRANCO, J.M. Rheology of food, cosmetics and pharmaceuticals. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v.4, n.4, p. 288-293, 1999.

GARCIA, S.; SANTOS, E.P.; LIMA, M.T.L.; RAMOS, M.F.S. Avaliação do fator de proteção solar por método *in vitro*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.2, n.72, p.39-41, 1991.

GASPAR, L. R.; MAIA CAMPOS, P.M.B.G. Rheological behavior and the SPF of sunscreens. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 250, n.1, p. 35-44, 2003.

GILLIES, R.; MOYAL, D.; FORESTIER, S.; KOLLIAS, N. Non-invasive *in vivo* determination of UVA efficacy of sunscreens using diffuse reflectance spectroscopy. **Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine**, v.19, n.4, p.190-194, 2003.

GRANATO, D.; ALVES DE CASTRO, I.; ELLENDERSEN, L.S.N.; MASSON, M.L. Physical stability assessment and sensory optimization of a dairy-free emulsion using response surface methodology. **Journal of Food Science**, v.75, n.3, p.S149-S155, 2010.

GREITER, F.; BILEK, P.; DOSKOCZIL, S.; WASHUTTL, J.; WURST, F. Methods for water resistance testing of sun protection products. **International Journal of Cosmetic Science**, v.1, n.3, p.147, 1979.

GREITER, F. Der sonnenschutzfaktor ist nur ein aspekt moderner sonnenschutzmitteln. **SÖFW Journal**, v.110, p.195-197, 1984.

GREITER, F.; GSCHNAIT, F. Effect of UV light on humans. **Photochemistry and Photobiology**, v.39, n.1, p.869-873, 2008.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Dados estatísticos sobre o câncer de pele. Disponível em: http://74.125.45.104/search?q=cache:TOfE5494pAJ:www.saude.df.gov.br/003/00301009.asp%3FttCD_CHAVE%3D66401+cancer+de+pele+dados+estatisticos&hl=pt-BR&ct=clnk&cd=18&gl=br. Acesso em: 13 out. 2008.

ISAAC, V.L.B.; CEFALI, L.C.; CHIARI, B.G.; OLIVEIRA, C.C.L.G.; SALGADO, H.R.N.; CORRÊA, M.A. Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 29, n.1, p. 81-96, 2008.

JAPAN COSMETIC INDUSTRY ASSOCIATION. **Measurements standards for UVA protection efficacy**. Tokyo: JCIA, 1995. p. 47-52.

KAIDBEY, K. Substantivity and water resistance os sunscreens. In: LOWE, N.J., ed. **Physician's guide to sunscreens**. New York: Marcel Dekker, 1991. p.177-182.

KLIGMAN, L.H.; AKIN, F.J.; KLIGMAN, A.M. The contributions of UVA and UVB to connective tissue damage in hairless mice. **The Journal of Investigative Dermatology**, v.84, n.4, p. 272-276, 1985.

LASHMAR, U.T.; BEESLEY, J. Correlation of rheological properties of an oil in water emulsion with manufacturing procedures and stability. **International Journal of Pharmaceutics**, v.91, n.1, p.59-67, 1993.

LEE, C.H.; MOTURI, V.; LEE, Y. Thixotropic property in pharmaceutical formulations. **Journal of Controlled Release**, v. 136, n.2, p. 88-98, 2009. [Review]

LEONARDI, G.R.; MAIA CAMPOS, P.M.B.G. Estabilidade de formulações cosméticas. **International Journal of Pharmaceutical Compounding**, v. 3, n. 4, p. 154-156, 2001.

LEVY, S.B. Sunscreens. In: WOLVERTON, S.E., ed. **Comprehensive dermatologic drug therapy**. 2.ed. Edinburgh: Elsevier Saunders, 2007. p.703-718.

LIM, H.W.; NAYLOR, M.; HONIGSMANN, H.; GILCHREST, B.A.; COOPER, K.; MORISON, W.; DELEO, V.A. American Academy of Dermatology Consensus conference on UVA protection of sunscreens: summary and recommendations, **Journal of the American Academy of Dermatology**, v.44, n.3, p.505-508, 2001.

LOWE, N.J. An overview of ultraviolet radiation, sunscreens, and photo-induced dermatoses. **Dermatologic Clinics**, v.24, n.1, p.9-17, 2006.

LUPO, M.P. Antioxidants and vitamins in cosmetics. **Clinics in Dermatology**, v. 19, n. 4, p. 467-473, 2001.

MANSUR, J.S.; BREDER, M.N.R.; MANSUR, M.C.A.; AZULAY, R.D. Correlação entre a determinação do fator de proteção solar em seres humanos e por espectrofotometria. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.61, n.4, p.121-124, 1986.

MASMOUDI, H.; DRÉAU, Y.L.E.; PICCERELLE, P.; KISTER, J. The evaluation of cosmetics and pharmaceutical emulsions aging process using classical techniques and a new method:

- FTIR. **International Journal of Pharmaceutics**, v.289, n.1-2, p. 117-131, 2005.
- MATSUI, M.S.; HSIA, A.; MILLER, J.D.; HANNEMAN, K.; SCULL, H.; COOPER, K.D.; BARON, E. Non-Sunscreen photoprotection: antioxidants add value to a sunscreen. **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**, v. 14, n. 1, p. 56-59, 2009.
- MILESI, S.S.; GUTERRES, S.S. Fatores determinantes da eficácia de fotoprotetores. **Caderno de Farmácia**, v.18, n.2, p.81-87, 2002.
- MONTEIRO, A. M. F. **Proteínas com funcionalidade mecânica**: um estudo físico-químico sobre a viscoelasticidade da gliadina, uma proteína de reserva do glúten do trigo. São Paulo, 2004. 195p. Tese de Doutorado – Instituto de Química – Universidade de São Paulo.
- MOYAL, D. How to measure UVA protection afforded by sunscreen products. **Expert Review of Dermatology**, v.3, n.3, p.307-313, 2008.
- MOYAL, D.; WICHROWSKI, K.; TRICAUD, C. *In vivo* persistent pigment darkening method: a demonstration of the reproducibility of the UVA protection factors results at several testing laboratories. **Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine**, v.22, n.3, p.124-128, 2006.
- NEVES, K. Testes de eficácia: é o que caracteriza o produto. **Revista de Negócios da Indústria da Beleza** (Temática Proteção Solar), n. 7, ano 3, p. 18-22, 2008.
- O'NEILL, J.J. Effect of film irregularities on sunscreen efficacy. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.73, n.7, p.888-891, 1984.
- PEARSE, A.D.; EDWARDS, C. Human stratum corneum as a substrate for *in vitro* sunscreen testing. **International Journal of Cosmetic Science**, v.15, n.6, p.234-244, 1993.
- PEDRIALI, C.A.; UCHOA, A.F.; BERNUSSO, L.C.; POLAKIEWICZ, B. The synthesis of a water-soluble derivative of rutin as an antiradical agent. **Química Nova**, v.31, n.8, p.2147-2151, 2008.
- PINTO, T.J.A.; FERRARINI, M.; GATTI, R.M. Proposta de roteiro prático para a validação de métodos analíticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas - Química Farmacêutica**, v.36, n.1, p.26-36, 2003.
- PISSAVINI, M.; ALARD, V.; HEINRICH, U.; JENNI, K.S.; PERIER, V.B.; TOURNIER, V.; LUTZ, D.; MELONI, M.; KOCKOTT, D.; FERRERO, L.; GONZALEZ, B.; ZASTROW, L.; TRONNIER, H. *In vivo* persistent pigment darkening method: proposal of a new standard product for UVA protection factor determination. **International Journal of Cosmetic Science**, v.29, n.6, p.451-460, 2007.
- PRISTA, L.N.; ALVES, A.C.; MORGADO, R. **Tecnologia Farmacêutica**. 5.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1995. p.597-668.
- RAI, R.; SRINIVAS, C.R. Photoprotection. **Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology**, v.73, n.2, p.73-79, 2007.

- RIBEIRO, A.M.; KHURI, E.; GOTTARDI, D. Validação de testes de estabilidade para produtos cosméticos. In: Anais do 10^o Encontro Brasileiro de Químicos Cosméticos. São Paulo, 1996; p. 349 – 375.
- RIBEIRO, H.M. Teoria de estabilidade de emulsões cosméticas. **Cosmetics & Toiletries**, v.14, n.4, p.88-90, 92, 2006.
- ROELANDTS, R. Shedding light on sunscreens. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 23, n.4, p. 147-157, 1998.
- ROSA, M.B.; OLIVEIRA, T.G.; CARVALHO, C.A.; SILVA, F.D.; CARVALHO, L.M.; NASCIMENTO, P.C.; PERES, R.L. Estudo espectrofotométrico da atividade fotoprotetora de extratos aquosos de *Achillea millefolium*, *Brassica oleracea* var. capitata, *Cyperus rotundus*, *Plectranthus barbatus*, *Porophyllum ruderale* (Jacq.). **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.5, n.1, p.101-110, 2008.
- ROUTABOUL, C.; DENIS, A.; VINCHE, A. Immediate pigment darkening: description, kinetic and biological function. **European Journal of Dermatology**, v.9, n.2, p.95-99, 1999.
- RUDOLPH, T. UVA protection assessment of sunscreens: a critical review on the UVA-to-UVB absorbance ratio. **SÖFW Journal**, v.130, n.9, p.28-35, 2004.
- SÁNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J.A.; SAURA-CALIXTO, F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 76, n.2, p. 270-276, 1998.
- SANTOS, E.P.; FREITAS, Z.M.; SOUZA, K.R.; GARCIA, S. *In vitro* and *in vivo* determinations of sun protection factors of sunscreen lotions with octylmethoxycinnamate. **International Journal of Cosmetic Science**, v.21, n.1, p.1-5, 1999.
- SAYRE, R.M.; AGIN, P.P.; LEVEE, G.J.; MARLOWE, E. A comparison of *in vivo* and *in vitro* testing of suncreening formulas. **Photochemistry and Photobiology**, v.29, n.3, p.559-566, 1979a.
- SAYRE, R.M.; AGIN, P.P.; LEVEE, G.J.; MARLOWE, E. Performance of six sunscreen formulations on human skin: a comparison. **Photochemistry and Photobiology**, v.115, n.1, p.46-49, 1979b.
- SAYRE, R.M.; STANFIELD, J.; BUSH, A.J.; LOTT, D.L. Sunscreen standards tested with differently filtered solar simulators. **Photodermatology, Photoimmunology, & Photomedicine**, v.17, n.6, p.278-283, 2008.
- SCHRAMM, G. **Reologia e reometria: fundamentos teóricos e práticos**. São Paulo: Artliber, 2006. p.232-235.
- SCHUELLER, R.; ROMANOWSKI, P. **Iniciação à Química Cosmética**. São Paulo: Tecnopress, 2002. v.1, p.23-29.
- SCHULZE, R. Wirksamkeit von UV absorbern und handelsüblichen sonnenschutzmitteln. **Journal of the Society of Cosmetic Chemists**, v.25, p.544-565, 1963.
- SHAATH, N.A. The chemistry of sunscreens. In: LOWE, N.J.; SHAATH, N.A.; PATHAK,

M.A., eds. **Sunscreens: development, evaluation and regulatory aspects**. 2.ed. New York: Marcel Dekker, 1990. p.263-283. (Cosmetic science and technology series, v.15).

SPRINGSTEEN, A.; YUREK, R.; FRAZIER, M.; CARR, K.F. *In vitro* measurement of sun protection factor of sunscreens by diffuse transmittance. **Analytica Chimica Acta**, v.380, n.2/3, p.155-164, 1999.

TADROS, T. Application of rheology for assessment and prediction of the long-term physical stability of emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v.108-109, p.227-258, 2004.

TONZAR, A.C. Medições de viscosidade e reologia em cosméticos. **Cosmetics & Toiletries (Edição em Português)**, v. 18, n. 3, p. 56-58, 2006.

UNITED STATES. Department of Health, Education and Welfare. Food and Drug Administration. Sunscreen drug products for over-the-counter human drugs; proposed safety, effective and labeling conditions. Proposed Monograph. **Federal Register**, v.43, n.166, p.38206-38269, 1978.

UNITED STATES. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Sunscreen drug products for over-the-counter human use. Final Monograph. Subpart D Testing Procedure, section 352.70 to 352.73 and 352.76 (Final Rule)-28302, 1993.

UNITED STATES. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Sunscreen drug products for over-the-counter human use. Final Monograph. **Federal Register**, n.64, n.98, p.27666-27693, 1999 (Final Rule). Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/DevelopmentResources/Over-the-CounterOTCDrugs/StatusofOTCRulemakings/ucm090244.pdf>. Acesso em: 14 jan. 2010.

UNITED STATES. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Sunscreen drug products for over-the-counter-human use: proposed amendment of final monograph. **Federal Register**, v.72, n.165, p.49070-49122, 2007. (Proposed Rule). Disponível em: <http://www.federalregister.gov/articles/2007/08/27/07-4131/sunscreen-drug-products-for-over-the-counter-human-use-proposed-amendment-of-final-monograph>. Acesso em: 13 mar. 2010.

URBACH, F. The historical aspects of sunscreens. **Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology**, v.64, n.2, p.99-104, 2001.

VELASCO, M.V.R.; BALOGH, T.S.; PEDRIALI, C.A.; SARRUF, F.D.; PINTO, C.A.S.O.; KANEKO, T.M.; BABY, A.R. Associação da rotina com p-metoxicinamato de octila e benzofenona-3: avaliação *in vitro* da eficácia fotoprotetora por espectrofotometria de refletância. **Latin American Journal of Pharmacy**, v.27, n.1, p.23-27, 2008a.

VELASCO, M.V.R.; SARRUF, F.D.; SALGADO-SANTOS, I.M.N.; HAROUTIOUNIAN-FILHO, C.A.; KANEKO, T.M.; BABY, A.R. Broad spectrum bioactive sunscreens. **International Journal of Pharmaceutics**, v.363, n.1/2, p.50-57, 2008b.

WALTER, J.F. Evaluation of seven sunscreens on hairless mouse skin. **Archives of Dermatology**, v.117, n.9, p.547-550, 1981.

WANG, S.Q.; BALAGULA, Y.; OSTERWALDER, U. Photoprotection: a review of the current and future technologies. **Dermatologic Therapy**, v. 23, n.1, p. 31-47, 2010.

WOLF, R.; WOLF, D.; MORGANTI, P.; RUOCCO, V. Sunscreens. **Clinics in Dermatology**, v. 19, n.4, p. 452-459, 2001.